

N° d'enregistrement
au CNRS : A.O. 6333

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE CLERMONT-FERRAND

par

Monsieur BIGOT Claude

pour obtenir

le Grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la thèse : ANALYSE DE QUELQUES FACTEURS DU BOURGEONNEMENT
SUR DES FRAGMENTS FOLIAIRES, EN PARTICULIER
CHEZ UN CLONE DE BEGONIA REX PUTZ.

Soutenue le 18 décembre 1971 devant la Commission d'examen

MM. CHAMPAGNAT	Président	
LOISEAU	}	Examineurs
GUILLOT		
Mme Jean NITSCH		Membre invité

PREMIER VOLUME : TEXTE DU MEMOIRE

N° d'enregistrement
au CNRS : A.O. 6333

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE CLERMONT-FERRAND

par

Monsieur BIGOT Claude

pour obtenir

le Grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la thèse : ANALYSE DE QUELQUES FACTEURS DU BOURGEONNEMENT
SUR DES FRAGMENTS FOLIAIRES, EN PARTICULIER
CHEZ UN CLONE DE BEGONIA REX PUTZ.

Soutenue le 18 décembre 1971 devant la Commission d'examen

MM. CHAMPAGNAT	Président	
LOISEAU	}	Examineurs
GUILLOT		
Mme Jean NITSCH	Membre invité	

PREMIER VOLUME : TEXTE DU MEMOIRE

Dr. J. J. ...
... 1912

THESE DE DOCTORAT SONT DES RECHERCHES SUR

... ..

A LA FACULTE DES SCIENCES DE CLERMONT-FERRAND

PAR

Monsieur ...

... ..

... ..

... ..
... ..
... ..



... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

A ma femme

A mes enfants

IN MEMORIAM

C'est avec consternation que le monde scientifique apprit le 29 juillet 1971 la disparition accidentelle du Docteur J. P. Nitsch. Très libéralement, Monsieur Nitsch m'avait accueilli d'abord au Phytotron de Gif-sur-Yvette, dont il fut l'un des responsables pendant plusieurs années, puis dans son laboratoire de Physiologie Pluricellulaire. Son amitié inaltérable, ses encouragements, ses conseils scientifiques ont été toujours pour moi d'un secours précieux dans l'accomplissement des recherches ici présentées ; Par son enthousiasme et son inépuisable créativité, Monsieur Nitsch savait susciter la vocation de chercheur ; son esprit de pionnier, sa volonté inébranlable et son ardeur au travail resteront sans nul doute un exemple pour les jeunes générations. Que Madame C. Nitsch, qui a accepté généreusement de participer à ce jury de thèse, veuille bien trouver ici l'expression de ma très vive reconnaissance et du respectueux souvenir que je porte à la mémoire de son époux .

AVANT - PROPOS

Monsieur le Professeur Champagnat, malgré des tâches multiples, a bien voulu accepter la présidence de ce jury de thèse ; je lui suis tout particulièrement reconnaissant de l'honneur qu'il m'a ainsi fait et je le remercie des conseils qu'il a bien voulu me donner .

Monsieur le Professeur Guillot a consenti à assumer la charge ingrate de rapporteur ; ses critiques et ses suggestions précieuses ont beaucoup contribué à mettre au point définitivement le texte de ce mémoire ; je lui exprime ici toute ma gratitude .

Monsieur le Professeur Loiseau a examiné ce travail avec beaucoup d'attention. Ses remarques m'ont été d'un grand secours . Qu'il soit vivement remercié de son obligeance .

Par leur compréhension et leur gentillesse, par leur assistance morale et scientifique, mes collègues du laboratoire de Physiologie Pluricellulaire, Mesdames Bui Dang Ha et C. Nitsch, Mesdemoiselles Norreel et Rossini, Messieurs Cognée, Dauta, Gandar, Harada, Jullien et Sandmeier, m'ont soutenu efficacement et encouragé à poursuivre mes efforts ; je leur exprime à tous ma très amicale reconnaissance .

Mesdames Brulfert, Chlyah-Arnason, Tran Thanh Van, du Phytotron de Gif-sur-Yvette, m'ont conseillé ou aidé dans la réalisation de l'étude histologique ; je les en remercie beaucoup .

Ma gratitude ira aussi à tout le personnel du laboratoire, particulièrement à Mademoiselle Hamon, Mesdames Knight et Masset pour leur aide technique si efficace et tout à fait indispensable .

Que les techniciens du Phytotron ou de l'Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture, mon point d'attache, soient remerciés pour leur compétence .

La dactylographie et la mise en-page ont été assurées par Madame Morice. Qu'elle soit louée de son dévouement et de son ardeur au travail .

Le service photographique et le service photocopie du CNRS à Gif sur Yvette ont accompli la multiplication des planches, tâche difficile, et l'impression du texte ; je leur adresse mes chaleureux remerciements .

Enfin que toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu au cours de ce long travail trouvent ici l'expression de ma grande reconnaissance .

PLAN DE LA THESE

PREMIER VOLUME : TEXTE DU MEMOIRE

CHAPITRE I - INTRODUCTION

CHAPITRE II - HISTORIQUE

CHAPITRE III - MATERIELS ET TECHNIQUES

- I - Choix du matériel végétal
- II - Réalisation et entretien des cultures
- III - Techniques cytologique
- IV - " histoautoradiographiques
- V - " d'extraction, de chromatographie et tests
 biologiques pour les substances de croissance .

CHAPITRE IV - ESPECES VEGETALES ET CAULOGENESE : ETUDE COMPAREE DES MODALITES DE LA NEOFORMATION EPIPHYLLE POUR QUELQUES ESPECES .

- I - Etude dynamique de l'apparition naturelle de racines
et de bourgeons à partir de feuilles isolées de
Peperomia griseo-argentea Yuncker .
- II - Etude succincte de l'apparition de bourgeons chez
quelques espèces de Lilium .
 - A - Choix du matériel .
 - B - Modalités macroscopiques de l'apparition des
néoformations .
 - C - Modalités microscopiques de l'apparition des
néoformations
 - D - Evolution de l'aptitude à bourgeonner chez les
organes d'origine foliaire de Lilium (x)
"Enchantment"
 - 1. Cas des feuilles isolées .
 - 2. Cas des pièces florales .

III - Etude dynamique de l'apparition naturelle des bourgeons à partir de fragments foliaires isolés de Begonia rex Putz .

- A - Etude de l'aptitude à la néoformation de racines et de bourgeons pour quelques variétés de Begonia rex Putz .
- B - Etude des conditions de prélèvement et de culture des explantats .
 - 1. Lieu de prélèvement des explantats sur les feuilles-mères .
 - 2. Influence de la surface des explantats sur le bourgeonnement .
 - 3. Durée de la culture .
 - 4. Position des explantats .
 - 5. Action des facteurs externes .
 - 6. Comparaison des aptitudes à la néoformation en fonction de la photopériode appliquée aux plantes mères .
 - 7. Age de la feuille .
 - 8. Conclusion .
- C - Etude histologique de la dynamique des néoformations pour le clone choisi .
 - 1. Au moment de la séparation des explantats .
 - 2. Après 1 jour .
 - 3. Après 3 jours .
 - 4. Après 13 jours .
 - 5. Après 5 semaines .
 - 6. Conclusion .

IV - Conclusions générales .

CHAPITRE V - EPIDERME ET CAULOGENESE .

- I - L'épiderme dépositaire de l'aptitude à bourgeonner chez Begonia rex : preuves expérimentales in vitro .
 - A - Tentative de culture d'épiderme isolé .
 - B - Effet de la suppression de l'épiderme sur l'aptitude à bourgeonner .
 - C - Obtention d'une culture de tissu .
 - D - Conclusion .
- II - Etude cytologique et métabolique des zones privilégiées d'initiation de bourgeons au cours des premières 48 heures après la séparation des explantats .
 - A - Etude cytologique des zones privilégiées d'initiation .
 - 1. Position des noyaux des cellules épidermiques adjacentes à la cellule basale du poil glanduleux .
 - 2. Caractéristique du noyau des cellules épidermiques adjacentes .

- 3. Recherches des histones dans les cellules épidermiques .
- B - Observations concernant l'incorporation de la thymidine tritiée au cours des premières 48 heures .
- C - Etude de l'incorporation de l'uridine tritiée au cours des 48 premières heures .
 - 1. Mise en place de l'expérience .
 - 2. Contrôle du marquage .
 - 3. Résultats préliminaires .
 - 4. Conclusions .
- D - Isolement physiologique des cellules basales des poils glanduleux .
 - 1. Action de l'acide glycocholique .
 - 2. Action du mannitol .
- E - Contrôle de la protéogénèse au cours des 48 premières heures .
- F - Conclusions .

CHAPITRE VI - POLARITE NATURELLE ET CAULOGENESE .

- I - Introduction .
- II - Etude de l'action d'un traumatisme physique sur la polarité de morphogénèse .
 - A - Mise en évidence de la polarité par découpage des feuilles .
 - B - Rôle de la nervure dans la polarité .
 - C - Rôle de l'interruption du transit dans la polarité et rôle de la blessure .
 - D - Observations histologiques au niveau de la section distale .
 - E - Influence de la suppression de la zone de morphogénèse proximale sur la polarité .
 - F - Conclusion sur l'étude de la polarité par des moyens physiques .
- III - Tentatives de mise en évidence du rôle des hormones endogènes dans la polarité de morphogénèse .
 - A - Action de l'acide triiodobenzoïque et du naphtylphtalamate de sodium sur le bourgeonnement dans le cas de Begonia rex .
 - B - Bilan des substances actives sur le test mésocotyle d'avoine au cours de la morphogénèse au niveau des sections proximales et distales d'explantats foliaires de Begonia rex .

C - Caractérisation de substances ayant une action de cytokinine .

1. Introduction .
2. Extraction de substances ayant l'activité des cytokinines à partir des écailles de Lilium (x) "Enchantment"
 - a) choix du stade de prélèvement.
 - b) protocole d'extraction et discussion .
 - c) résultats .
3. Extraction des substances ayant l'activité des cytokinines à partir des feuilles de Begonia rex .

IV - Conclusion sur la polarité de morphogenèse d'explantats foliaires de Begonia rex .

CHAPITRE VII - EFFETS DE L'APPLICATION EXOGENE DE QUELQUES FACTEURS CHIMIQUES SUR L'APTITUDE A BOURGEONNER .

I - Introduction .

II - Effets de l'application de quelques substances et hormones sur la néoformation d'organes chez Begonia rex .

A - Effets des bases puriques et pyrimidiques et de leurs précurseurs ou dérivés .

1. Introduction .
2. Effets des précurseurs de bases puriques ou pyrimidiques .
3. Effets des bases puriques et pyrimidiques et de leurs dérivés ribosylés et phosphorylés .
4. Effets de dérivés adényliques substitués en position 6 (cytokinines) .
 - a) effet d'un apport exogène sur le bourgeonnement .
 - b) lieu et précocité de l'action de la benzylaminopurine .
5. Effets de certaines antipurines ou d'inhibiteurs de cycle de l'adénine sur l'aptitude à la néoformation chez Begonia rex .

B - Effets de l'application conjuguée d'une auxine et d'une cytokinine .

C - Effets de l'acide gibbérellique .

1. Introduction .
2. Modalités d'action .
3. Réversion de l'effet de l'acide gibbérellique .
4. Effets histologiques de l'acide gibbérellique observés après 5 semaines de culture .

D - Effets de quelques autres substances .

1. Substances ayant des propriétés de cytokinines .
2. Morphactine .
3. Acide abscissique .
4. Retardants .

E - Conclusions .

III - Effets comparés de la 6-benzylaminopurine, de la 2,6-diaminopurine et de l'acide gibbérellique sur l'incorporation de la thymidine tritiée au niveau des zones privilégiées d'initiation de bourgeons épiphyllés d'un clone de Begonia rex .

A - Expérience préliminaire .

B - Résultats et discussion de l'expérience définitive .

1. Introduction .
2. Etude du témoin .
3. Etude de l'effet de la 6-benzylaminopurine .
4. Etude de l'effet de la 2,6-diaminopurine .
5. Etude de l'effet de l'acide gibbérellique .

C - Conclusions .

IV - Détermination du moment de l'induction au bourgeonnement : effets de quelques antimétabolites .

A - Introduction .

B - Effets des antimétabolites sur l'induction au bourgeonnement .

1. Effets de la 5-bromodeoxyuridine .
2. Effets du 5-bromouracile .
3. Effets de la 5-fluorodeoxyuridine .
4. Effets de la deoxyadénosine .
5. Effets de l'actinomycine D .
6. Effets de deux inhibiteurs de la protéogenèse : l'actidionne et la chloramphénicol .

C - Conclusions .

CHAPITRE VIII- DISCUSSION .

RESUME .

DEUXIEME VOLUME : PLANCHES ET BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'apparition de novo de structures différenciées en organes est l'un des problèmes fondamentaux de la biologie. Toutes les cellules d'un végétal possèdent en principe l'équipement génétique nécessaire et suffisant à la reconstitution d'un individu de l'espèce ; mais, au cours du développement, de multiples corrélations empêchent l'expression anarchique des potentialités du génome et une séquence ordonnée de la morphogenèse s'établit. Notons qu'au cours de la mise en place de l'embryon, la position relative des cellules détermine chacune d'entre elles (ou un petit groupe) à se différencier physiologiquement à un moment précis de l'évolution et à acquérir des caractères de spécialisation ; cette différenciation serait liée à la répression de certains systèmes métaboliques .

Sous l'action de divers stimulus, comme par exemple l'interruption des corrélations entre les organes, des cellules adultes et différenciées sont capables de retrouver leur capacité mitotique et de régénérer rapidement des amas cellulaires ; ceux-ci peuvent donner naissance soit spontanément, soit sous l'influence de certains messagers chimiques (hormones), à des structures organisées (par exemple bourgeons, racines...). Les expériences montrent que les cellules végétales ont une aptitude plus grande à exprimer complètement leurs potentialités en comparaison des cellules animales. Le cas le plus intéressant est constitué par l'apparition de structures embryonnaires soit à partir de cultures de tissu (Halperin et Wetherell, 1964), soit à partir de cellules séparées ou de grains de pollen (Guha et Maheshwari ,

1966 ; Bourgin et Nitsch, 1967...). Ce phénomène répond véritablement à la notion de totipotence cellulaire telle qu'elle est définie par Steward (1970) : aptitude pour une cellule unique à reconstituer les stades ontogéniques depuis l'embryon jusqu'à la plante entière fertile. Malheureusement il est rare que les cellules différenciées libres placées dans des conditions favorables de culture "acceptent" de proliférer en formant d'abord un organe embryonnaire ; à ce propos, la connaissance précise des facteurs du développement de l'embryon in situ est capitale ; il en est de même de la recherche des substances qui provoquent le retour à l'activité mitotique, provisoirement disparue dans la plupart des cellules différenciées .

La naissance d'une structure coordonnée et fonctionnelle suppose l'existence d'un complexe organisateur bien défini, dans lequel les hormones (auxines, cytokinines...) peuvent jouer un rôle fondamental (Skoog et Tsui, 1949). L'impossibilité de transformer des apex racinaires en apex caulinares après leur organisation montre que le marquage des cellules est "indélébile". L'étude de la néoformation naturelle ou provoquée d'organes peut être un moyen d'approche de la connaissance des séquences qui mènent d'une cellule quiescente à une structure organisée.

C'est dans cet esprit que le choix de notre sujet, la néoformation d'organes, a été fait ; on doit souligner ici son incidence possible dans le domaine agronomique. Les modalités et les facteurs de l'apparition des racines adventives ont été largement inventoriées, comme l'indiquent les études critiques ou recherches de Bouillenne et Went (1933), Bouillenne (1964), Champagnat (1961), Fernquist (1966) et Guillot (1967). C'est donc la néoformation des bourgeons qui a été adoptée comme thème de travail. L'obtention de bourgeons sur les cultures de tissus ayant fait l'objet de nombreux travaux, nous avons préféré étudier les modalités d'apparition d'ébauches caulinares à

partir de fragments d'espèces végétales possédant naturellement l'aptitude à la néoformation. Les investigations ont porté sur du matériel foliaire, dont les cellules ne sont pas "marquées" en apparence par une potentialité racinaire ou caulinaire, et dont la vocation, sauf quelques cas, n'est pas de reconstituer un végétal entier. Dans un premier temps, nous avons entrepris une étude morphologique et histologique précise des modalités de la néoformation naturelle pour quelques espèces dans le but de choisir un matériel convenable : en effet, la connaissance des séquences menant à la néoformation est indispensable à toute interprétation de l'action de substances sur la morphogénèse et nécessaire à toute investigation par une voie métabolique. Pour des raisons qui seront exprimées au cours de ce travail, nous avons opté pour l'espèce Begonia rex Putz (clone issu du cultivar "Silver Queen"). Puis, sur ce matériel végétal, par l'emploi de méthodes faisant appel aux techniques de l'histochimie et de l'autohistoradiographie, nous avons tenté d'analyser les facteurs naturels de la réactivité cellulaire conduisant au bourgeonnement. En particulier, le phénomène de la polarité de morphogénèse a été préoccupant ; nous avons essayé de pénétrer ce problème soit par l'étude des réactions provoquées par des traumatismes modifiant le jeu normal des corrélations, soit par l'étude des facteurs hormonaux endogènes, soit enfin par l'étude pharmacodynamiques de certaines substances stimulant ou inhibant la mitose et l'organogénèse. Lorsque les séquences précises d'apparition des néoformations ont été connues, l'application de certains antimétabolites à des instants choisis a permis de délimiter plus nettement le moment de l'induction au bourgeonnement. Ce sont donc les résultats obtenus par l'exploration de ces diverses voies de recherches qui seront exposés dans les pages qui suivent .

CHAPITRE II

HISTORIQUE

La reconstitution d'une plante à partir d'un fragment quelconque du végétal est obtenue couramment dans la pratique horticole du bouturage. L'utilisation de la partie axiale est la plus fréquente: il se pose le plus souvent un problème d'enracinement. La néoformation de bourgeons est un phénomène moins habituel. On trouvera dans les mises au point de Champagnat (1961) et de Dore (1965) l'exposé des facteurs qui peuvent être impliqués dans la caulogenèse .

1 - Sur des feuilles de Phanerogames, la première mention de morphogenèse de racines et de bourgeons a été faite par Madriola en 1652. Naudin (1840) signala la formation de bourgeons sur des feuilles de Drosera intermedia et Beihling en 1883 étudia la néoformation sur des feuilles isolées de Peperomia. Dès 1907 Winkler souligna que la formation de primordiums commence à partir de cellules épidermiques de feuilles chez le Torenia asiatica. Le bourgeonnement de la cardamine des prés a été étudiées par Goebel en 1908 : il mis en évidence la présence de zones méristématiques préformées au point de concours des nervures, zones dont le développement est lié à un système de corrélations internes. Après Regel (1876), Hartsema (1926) étudia avec précision l'apparition des ébauches dans le cas de Begonia rex, ébauches dont l'origine épidermique est bien montrée. Cet auteur insista déjà sur l'importance du phénomène de dédifférenciation cellulaire, étudié en détail beaucoup plus tard par Buvat (1944, 1965). Behre (1929) nota la naissance des méristèmes à partir des cellules

épidermiques de la face supérieure de la feuille de Drosera, cellules situées à la base des tentacules, fait observé de nouveau par Favard (1963). En 1930 et 1933, Chouard montra chez diverses espèces de Liliacées l'intervention de l'épiderme dans la régénération des bourgeons. En 1931, Hagemann publie une étude extensive sur le phénomène de morphogenèse à partir de feuilles isolées, étude qui est une source inépuisable de documents concernant les Monocotylédones, Dicotylédones et Gymnospermes. Sur 1200 espèces recensées, 46 forment normalement des bourgeons sur les feuilles en place, 289 sur les feuilles détachées, 501 espèces donnent des racines sans bourgeonner. L'aptitude à la régénération est particulièrement développée dans les familles des Solanacées, Acanthacées, Amaranthacées, Begoniacées, Crassulacées, Pipéracées, Gesneriacées et Liliacées. 78 % des espèces de Monocotylédones ne manifestent aucune aptitude à la néoformation à partir des feuilles isolées, alors que 25 % seulement des Dicotylédones périssent sans réaction. En 1937, Naylor et Johnson montrèrent l'origine épidermique des bourgeons qui s'organisent sur les feuilles de Saintpaulia inonantha. A partir de 1932 et pendant de nombreuses années, Prévot fixa son attention sur le Begonia rex, Il sera fait état de ses travaux au cours de ce travail. En 1940, Walker étudia la régénération des bulbilles à partir d'écailles isolées de Lilium et souligna le rôle de l'assise sous-épidermique. Enfin, Marchal (1968) réalisa une étude histologique approfondie de la formation des bourgeons sur les feuilles de Cardamine pratensis. Seules les études les plus importantes sont citées ici. Il existe beaucoup d'autres observations portant sur l'apparition des néoformations épiphylls.

Toutefois, il faut souligner encore le cas particulier de la formation de bourgeons, à partir de zones méristématiques préétablies sur les feuilles en place de diverses espèces de Bryophyllum ; l'histogenèse en a été étudiée par de nombreux auteurs (Yarbrough, 1932 ; Naylor, 1942 ; Resende, 1959, etc...). Ces formations apparaissent à

partir de cellules sous-épidermiques situées dans les encoches foliaires marginales ; leur développement est lié au photopériodisme (conditions de jours longs) ou à la séparation de la feuille et de la plante mère (Götz, 1953 ; Resende, 1959) .

Enfin, l'apparition de bourgeons et de racines sur les cotylédons a été rapportée par Larue en 1933 pour de nombreuses espèces. Il serait intéressant certainement d'approfondir une telle étude pour savoir si le passage de la feuille la plus juvénile (cotylédon) à la feuille adulte s'accompagne de la perte de l'aptitude à la néoformation .

En conclusion, ces recherches histologiques permettent de dégager un fait fondamental pour les phanérogames : l'aptitude à bourgeonner se "démasque" après suppression des corrélations avec la plante-mère, au niveau des cellules épidermiques ou sous-épidermiques, du côté de la face supérieure des feuilles. Par contre, les racines sont toujours d'origine perflibériennes. Il y a donc, au cours du développement, une localisation spécifique des potentialités de morphogenèse .

2 - Les fougères sont capables de former des bourgeons épiphylls : les différents cas de morphogenèse ont été décrits par Kupper (1906), étude complétée par Beyerle (1932). Des observations plus précises sur des espèces particulières sont rapportées : Camptosaurus rhizophyllus par Mac Veigh (1934) et Yarbrough (1936), Cystopteris fragilis et Osmunda regalis par Lawton (1936), Tolmiea Menziesii par Yarbrough (1936). Mac Veigh (1937) cita, dans une publication d'ensemble, 197 espèces (appartenant à 35 genres) qui bourgeonnent pour la plupart sur les feuilles en place. Plus récemment, Marchal (1965 et 1969) reprend cet inventaire avec un grand souci de classification et de comparaison avec les phanérogames, et décrit avec précision le cas de l'Asplenium bulbiferum (1965) .

3 - Les mousses et les hépatiques ont été peu étudiées vis à vis de la régénération à partir des lames chlorophylliennes (feuilles) ou des thalles chlorophylliens. Dans le cas de Polytrichum juniperinum, Gay (1970) montre que la régénération de pousses feuillées à partir des feuilles isolées nécessite la formation préalable d'un protonema. Par contre, l'épiderme des tiges feuillées est capable de donner naissance directement à des formations caulinaires . Dans le cas des hépatiques, les feuilles de Noteroclada confluens bourgeonnent directement ; on peut observer par contre pour Blasia pusilla la formation de "tubes germinatifs" dont l'extrémité donnera naissance à un nouveau thalle portant des ébauches foliaires (Allsopp et Ilahi, 1970). Pour cette catégorie de végétaux, il y a des recherches plus nombreuses concernant la stimulation du bourgeonnement à partir du protonema (Bopp, 1968) ou sur les apex propagulifères (Berthier, 1970) .

4 - Ce bref rappel historique montre donc assez clairement que le tissu foliaire peut constituer un matériel intéressant pour l'étude des facteurs du bourgeonnement. Pour le Begonia rex, des fragments de feuilles ont été utilisés par Bouillenne et Prévot (1932), puis par Prévot en 1935 et les années suivantes. Cet auteur a introduit la méthode expérimentale pour l'étude systématique du bourgeonnement ; il est vraisemblablement le premier à avoir montré sans le soupçonner le rôle stimulateur des purines, en employant un engrais à base d'excréments de pigeons (Colombine) riches en acide urique (1937). Parmi ses résultats, les plus intéressants sont ceux qui mettent en évidence le caractère génétique de l'aptitude à néoformer des bourgeons et sa transmission au cours de croisements divers entre espèces de Begonias. La cardamine des prés a été employée par Paulet et Nitsch (1959) pour l'étude de facteurs exogènes pouvant influencer le développement des bourgeons foliaires : les bases puriques et pyrimidiques, quelques précurseurs ou vitamines, se sont montrés stimulateurs .

Les méthodes de cultures in vitro en milieu synthétique aseptique ont permis de faire progresser nos connaissances sur les facteurs de la morphogenèse, mais le tissu foliaire a été peu utilisé à cause de sa fragilité et des difficultés de désinfection (Turel et Howes, 1956 ; Toponi, 1963 ; Maheshwari, 1965 ; Gupta, 1966 ; Chlyah, 1969). Pour la première fois, White (1939) montra la possibilité d'obtenir des bourgeons en milieu liquide sur les tissus tumoraux de l'hybride Nicotiana glauca x N. langsdorffii ; puis les nombreuses études de Gautheret (de 1940 à 1944) ont révélé la possibilité d'obtenir des bourgeons à partir de la zone cambiale isolée (orme, peuplier, etc...). C'est encore au moyen de cultures in vitro que Skoog et Tsui (1948) mirent en évidence le rôle fondamental de l'adénine dans l'organogenèse de bourgeons à partir de tiges de tabac, en interaction avec l'auxine. Les cytokinines se montrent incomparablement plus actives dans cette stimulation et Skoog et Miller (1957), à partir de moelle de tabac, formulèrent que la morphogenèse pourrait être régie par un équilibre hormonal auxine-kinétine : le déplacement de cet équilibre vers la première ou la seconde entraîne soit la formation de racines, soit la formation de bourgeons. De nombreux résultats appuient cette théorie, mais il y a quelques exceptions : par exemple, les tissus de Nicotiana glauca et Nicotiana glutinosa ne bourgeonnent pas en présence d'une cytokinine (Levine, 1950). Pour déterminer les facteurs endogènes liés à l'aptitude au bourgeonnement, on pouvait tenter d'utiliser des espèces possédant (Nicotiana suaveolens) ou non (Nicotiana glauca) cette aptitude et leur hybride (Paulet et Nitsch, 1965) : on observe que le premier est plus riche en auxine et en glucides que le second ou que l'hybride . Par contre, il a été impossible d'extraire les cytokinines endogènes, ce qui n'a pas permis de relier l'aptitude au bourgeonnement à une éventuelle capacité de synthèse de ces substances ; Nicotiana glauca est insensible à une stimulation exogène par la kinétine, mais on a pu noter qu'un abaissement de la concentration en saccharose du milieu de culture a permis d'obtenir des bourgeons à partir de cette espèce ; un traitement par une cytokinine naturelle

(isopentenyladénine) a donné des résultats positifs (Paulet et Nitsch, 1963). Parmi les facteurs du bourgeonnement, les cytokinines semblent tenir une place privilégiée mais, malgré de nombreuses investigations, on ignore toujours par quelle voie elles orientent la morphogenèse . Nous tenterons de donner quelques hypothèses à ce sujet. Il y a bien d'autres facteurs qui interviennent dans la néoformation des bourgeons; nous ne pouvons les envisager tous ici. Par ces quelques lignes, nous désirons attirer l'attention sur le rôle organogénétique des hormones, effet qu'il faut considérer comme fondamental .

CHAPITRE III

MATERIEL ET TECHNIQUESI - CHOIX DU MATERIEL VEGETAL .

Dans une expérience préliminaire, diverses espèces ont été éprouvées en milieu contrôlé, afin de comparer les modalités d'apparition des néoformations caulinaires (Bigot, 1966). Il importe en effet de choisir avec soin le matériel d'expérimentation. Les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau 1, dont on peut tirer les conclusions suivantes :

En dehors des cas où les bourgeons se forment spontanément sur les feuilles en place à partir de zones méristématiques préétablies (Bryophyllum, Cardamine, diverses fougères...), plusieurs modalités de néoformation des bourgeons peuvent être dégagées :

1er cas - les racines et les bourgeons se forment, en apparence indépendamment, soit directement à partir de la feuille-mère sans différenciation d'un cal (Begonia rex), soit secondairement, après la mise en place d'un cal (Alloplectus) ;

2ème cas - seules les racines se forment directement à partir du fragment foliaire, les bourgeons apparaissant secondairement à la base de ces racines néoformées (Peperomia). Ce phénomène sera étudié avec précision d'un point de vue histologique, mais, à priori, une telle modalité n'est pas favorable à l'étude expérimentale du bourgeonnement adventif ;

TABLEAU 1 - Néofomation de racines et de bourgeons à partir de feuilles isolées de quelques espèces .

Famille et espèce	Formation de racines à partir de la feuille-mère	Polarité de la rhizogenèse	Formation des bourgeons à partir de la feuille-mère	Formation des bourgeons sur la base des racines néoformées	Présence d'un cal tumoral portant les bourgeons néoformés	Polarité de la caulogénèse
<u>Acanthacées</u>						
<u>Strobilanthes dyerianus</u> Mast.	0	0	0	0	cal sans morphogénèse	0
<u>Begoniacées</u>						
<u>Begonia albo.picta</u> Mort. x	+	+	0	0	0	0
<u>B. corallina</u> Carr.						
<u>B. boweri</u>	+	+	+	0	0	+
<u>B. gigantea</u> Wall.	+	+	0	0	0	0
<u>B. imperialis</u> Lem.	+	+	+	0	0	+
<u>B. rex</u> Putz.	+	+	+	0	0	+
<u>B. socotrana</u> Hook	+	+	0	0	cal sans morphogénèse	0
<u>Crassulacées</u>						
<u>Kalanchoe blossfeldiana</u> Poel.	+	+	0	0	+	+
<u>Gesneriacées</u>						
<u>Alloplectus linkii</u> Hook.	+	+	0	0	+	+
<u>Episcia tessellata</u> Linden	+	+	0	0	+	+
<u>Saintpaulia ionantha</u> H. Wendl.	+	+	+	0	0	+
<u>Streptocarpus wendlandii</u> Sprengler.	+	+	0	0	+	+
<u>Liliacées</u>						
<u>Endymion non-scriptus</u> L.	0	0	+	0	0	+
<u>Lilium candidum</u> L.	0	0	+	0	0	+
<u>L. martagon</u> L.	0	0	+	0	0	+
<u>Sansevieria trifasciata</u> Prain.	+	+	0	+	0	+
<u>Passifloracées</u>						
<u>Passiflora coerulea</u>	0	0	0	0	cal sans morphogénèse	0
<u>Pipéracées</u>						
<u>Peperomia argentea</u> Dietr.	+	+	0	+	0	+
<u>P. argyreia</u> E. Morr.	+	+	0	+	0	+
<u>P. griseo-argentea</u> Yunker	+	+	0	+	0	+
<u>P. magnoliaefolia</u> Dietr.	+	+	0	+	0	+
<u>P. scandens</u> Riz. et Pav.	+	+	0	+	0	+
<u>P. verschaffeltii</u> Lem.	+	+	0	+	0	+

3ème cas - les bourgeons se différencient à partir de la feuille-mère ou de l'écaïlle-mère (Lilium), une rhizogenèse adventive se manifestant ultérieurement au niveau de ces bourgeons (bulbilles du Lilium) ; aucune racine ne se forme à partir de l'explantat ;

4ème cas - les racines se différencient à partir de la feuille isolée, mais aucune organogenèse de type caulinaire ne fait suite à cette initiation (Begonia socotrana et beaucoup d'autres espèces). De telles espèces peuvent être favorables à l'étude des facteurs exogènes induisant l'apparition des bourgeons mais, du point de vue expérimental une voie fructueuse d'investigation utilisant les inhibiteurs du métabolisme ou de la morphogenèse est moins accessible ;

5ème cas - enfin, de nombreuses espèces ne montrent aucune activité de morphogenèse bien que les feuilles se maintiennent longtemps en survie ; il y a quelques fois formation naturelle de cals volumineux au niveau des sections nervaires (Passiflora).

En dernier lieu, il faut souligner la polarité stricte de morphogenèse qui s'est manifestée pour toutes les espèces : en effet, les néoformations se localisent strictement au niveau des sections nervaires, située du côté du pétiole de la feuille, que nous appellerons "section proximale", par opposition à la "section distale", située du côté de l'apex de la feuille (on peut utiliser aussi les termes de "section pétiolaire" et de "section foliaire" pour les 2 pôles de l'explantat). Le caractère polarisé des néoformations fera l'objet d'une étude plus approfondie. Ce résultat préliminaire nous conduira à envisager plus précisément par des méthodes histologiques la dynamique d'apparition des bourgeons chez le Peperomia, le Lilium et le Begonia rex (Chapitre IV) .

II - REALISATION ET ENTRETIEN DES CULTURES .

Les plantes ont été élevées en serre ordinaire avec un appoint lumineux non contrôlé les plaçant en condition de jours longs, à la tempé-

rature de 24-28° C pendant le jour et 18-22° pendant la nuit, sur terreau **dé** couches (1/3) allégé par de la tourbe horticoles (1/3) et du sable de rivière (1/3). Le Begonia rex ne s'est pas maintenu sur un support de "Vermiculite" et laine de verre arrosé de la solution nutritive standard utilisée au Phytotron de Gif-sur-Yvette (Nitsch, 1965). Une trop forte intensité lumineuse entraîne une réduction de la croissance des feuilles, qui deviennent anormalement cassantes et gaufrées. Toutes les espèces ont été clonées, sauf le lis, et les cultures ont été renouvelées régulièrement (environ tous les 6 mois). Une attention particulière a été portée sur le choix des feuilles : on prélève les explantats en général sur la 2ème ou 3ème feuille bien développée à partir de l'apex ; on expérimente ainsi sur des organes se trouvant à un même stade de développement. Des expériences préliminaires, destinées à explorer rapidement le matériel, ont été réalisées sur du sable stérilisé par autoclavage ; en chambre humide. Pour toutes les expériences faisant intervenir des traitements, les feuilles, dont le pétiole a été préalablement paraffiné, ont été désinfectées par le filtrat d'une suspension à 4 % d'hypochlorite de calcium pendant 5 à 7 minutes . Nous avons employé des lots homogènes de 12 explantats, constitués à partir de 3 ou 4 feuilles différentes (12 explantats par feuille), prélevés sur les nervures principales à l'emporte-pièce (diamètre 18 mm) ou au scalpel (carrés de 1,5 cm de côté). Cette opération a pour but de réduire la variabilité du matériel. Les explantats ont été traités par flottation sur des solutions diverses, puis rincés 3 fois à l'eau stérile, séchés entre deux feuilles de papier stérile et mis en culture dans une boîte de Petri stérilisée (diamètre 9 cm) dont le fond est garni de 2 disques de papier filtre Whatman n° 1. Chaque boîte de culture a été placée dans une chambre humide constituée par une deuxième boîte de diamètre 15 cm contenant un disque de papier filtre humide . Un morceau d'éponge stérilisé a permis de maintenir l'humidité dans la boîte de culture sans qu'il ait été nécessaire de faire un apport d'eau pendant la durée des expériences. Seule, la chambre humide a été alimentée en eau distillée stérile. Le dénombrement des bourgeons (point méristématiques ayant produit au moins une feuille) est effectué sous la loupe après 5

semaines ; cette période a été déterminée expérimentalement .

Le choix du milieu de culture a été préoccupant. Après diverses expériences, nous avons opté pour la culture sur eau distillée. En effet, il est toujours intéressant de simplifier au maximum les conditions de culture ; l'intervention d'un milieu complexe rend inévitablement plus difficile l'interprétation des résultats, car on se trouve dans l'impossibilité de définir clairement l'action d'une substance compte tenu de synergies indécélables entre cette substance et les différents composés du milieu. C'est la raison pour laquelle un matériel végétal dont la réponse est possible en présence d'un seul facteur hydrique peut constituer un élément intéressant d'expérience : c'est le cas de Begonia rex. Aucune étude systématique des facteurs minéraux, vitaminiques ou glucidiques susceptibles d'améliorer le bourgeonnement ou de modifier la polarité n'a été entreprise ici. Ces facteurs, sans aucun doute, peuvent constituer des éléments limitant la formation des bourgeons ; ainsi, certaines recherches montrent que l'inanition diminue, le taux de synthèse des ARN, donc celui des protéines ; le niveau de synthèse peut par exemple être restauré par un apport de sulfate (Randall, 1969). Vis-à-vis des disponibilités en énergie potentielle, un contrôle cytologique montre, par l'accumulation permanente d'amidon dans les explantats, que celles-ci restent importantes au cours de la morphogenèse, même après 5 semaines de survie. On peut évidemment penser que si l'inanition inhibe la synthèse d'un enzyme ou de plusieurs enzymes intervenant dans la dégradation de ce composé ^{de} réserve, celui-ci se trouve irrémédiablement bloqué dans une forme inutilisable. Cependant, quelques expériences ont montré qu'un milieu gélosé complet (Knop ou Murashige et Skoog) avec glucose ne modifiait ni la polarité, ni le nombre de bourgeons, ni la dominance. Les boîtes de cultures ont été placées en chambre climatisée à 22° C, sous un éclairage de 2000 à 2600 lux de 16 heures par jour (tubes fluorescents Mazdafluor de 40 W, type "lumière du jour de luxe" situés à 30 cm des boîtes). Ces conditions de culture ont été déterminées expérimentalement

(Chapitre IV) et maintenues identiques pour toutes les expériences .

Les cultures en tubes, lorsqu'elles ont été mises en place, ont été réalisées sur milieu de Knop au demi, sur milieu de Murashige et Skoog ou sur milieu de Lin et Staba, dont les formules sont les suivantes :

Milieu de Murashige et Skoog (1962) - Macroéléments (en g. par litre de milieu) : NH_3NO_3 (6,6) ; KNO_3 (7,7) ; CaCl_2 , 2 H_2O (1,76) ; MgSO_4 , 7 H_2O (1,48) ; $\text{K PO}_4\text{H}_2$ (0,68) - Oligoéléments (en g. par litre de solution et 1 ml de la solution pour 1 litre de milieu) : MnSO_4 , 4 H_2O (25) ; H_3BO_3 (10) ; Zn SO_4 , 4 H_2O (10) ; IK (1) ; Na_2MoO_4 , 4 H_2O (25) ; Cu SO_4 , 5 H_2O (0,025) ; CaCl_2 , 6 H_2O (0,025) - Addenda (en mg. pour 20 ml d'eau distillée et 1 ml de la solution pour 1 litre de milieu) : Glycine (40) ; myo-inositol (2000) ; acide nicotinique (100) ; pyridoxine, HCl (10) ; thiamine HCl (10) ; biotine (1) ; acide folique (10) - Fer : 5 ml d'une solution obtenue en dissolvant 7,45 g de Na_2EDTA (éthylène-diaminetétraacétate de sodium) et 5,57 g de FeSO_4 par litre d'eau distillée - Saccharose : 30 g/litre - Bacto-agar DIFCO (8 g/litre) .

Milieu de Knop au demi-Macroéléments (en g. pour 1 litre de milieu) : $\text{Ca (NO}_3)_2$, H_2O (2) ; KNO_3 (0,5) ; MgSO_4 , 7 H_2O (0,5) ; $\text{K H}_2\text{PO}_4$ (0,5) . Les oligoéléments, addenda, fer, saccharose et agar ont été ajoutés comme précédemment .

Milieu de Lin et Staba (1961) - Macroéléments (en g. pour 1 litre de milieu) : KNO_3 (3,8) ; NH_4NO_3 (11,6) ; MgSO_4 , 7 H_2O (0,75) ; CaCl_2 (0,675) ; KH_2PO_4 (0,275) - Oligoéléments, addenda et agar comme pour le milieu de Murashige et Skoog - Saccharose : 20 g/l - Adénine : 80 mg/l - Kinétine : 0,2 mg/l - Pantothenate de Calcium : 1 mg/l - L. proline : 35 mg/l - Extrait de levure : 5 g .

Dans tous les cas, le pH a été ajusté à 5,5 par NaOH N. Les milieux ont été autoclavés pendant 20 minutes à 120° C. Les substances de croissance ont été dissoutes préalablement à leur addition ; les cytokinines dans de

l'eau distillée acidulée par HCl 0,1 N et à chaud, les auxines dans l'eau distillée chaude en présence d'une goutte de méthanol. Les gibbérellines ont été préparées dans l'eau distillée froide et stérilisées par filtration .

D'une manière générale, les explantats foliaires subsistent mal sur des milieux gélosé : asphyxie fréquente avant la formation des bourgeons, et allongement de la période de morphogenèse. D'autre part, la méthode des traitements différés dans le temps nécessite des transferts fréquents qui multiplie les risques d'infection et de destruction des explantats. Pour ces raisons, la culture d'explantats foliaires sur milieu gélosé n'a pas été employée. Le bouturage en tube sur laine de verre n'a pas donné de meilleurs résultats. Nous avons donc choisi de maintenir les explantats en survie en boîte de Petri, dans les conditions décrites précédemment .

Enfin, dans les tableaux de résultats, le seuil de probabilité pour le calcul de l'intervalle de confiance de la moyenne, a toujours été de 5 % .

III - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES .

Les tissus ont été fixés par le mélange : éthanol 95 % (85 ml), aldéhyde formique à 35 % (10 ml) et acide acétique concentré (5 ml) ou par le mélange (F.A.A.) : éthanol à 50 % (90 ml), aldéhyde formique à 35 % (5 ml), et acide acétique (5 ml), pendant 18 à 24 heures. Les échantillons ont ensuite été déshydratés et inclus dans la paraffine suivant la méthode décrite par Jensen (1962). Les coupes ont été faites entre 6 et 8 μ . Elles ont présenté quelques difficultés pour le *Begonia rex* à cause des cristaux d'oxalate de calcium, et de sclérites très résistants. Après déparaffinage, suivant les réactions recherchées, les colorations suivantes ont été pratiquées, en accord avec les méthodes décrites par Jensen (1962) .

A - Observations purement histologiques ; coloration double à la safranine et vert solide FCF (Fast green), ou coloration par l'hématoxyline ferrique .

B - Mise en évidence des acides nucléiques : vert de méthyle - pyronine (coloration d'Unna), accompagné du test de spécificité de la coloration due à la pyronine par action de la ribonucléase à 0,1 % à pH 6,8 à la température de 40° C pendant 4 heures préconisé par Brachet (1953) .

C - Mise en évidence des histones : vert solide FCF en milieu alcalin (pH 8,1) suivant la méthode d' Alfert et Geschwind (1953), après hydrolyse par l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % à 90° C pendant 20 minutes (libération des groupements NH_2 , liés aux acides nucléiques). Les préparations correspondant aux divers stades étudiés ont été réparties dans chaque série de coloration, de façon à éviter les erreurs dues à un manque de fidélité de la méthode. La spécificité de la coloration a été éprouvée :
1° soit en omettant l'hydrolyse par le TCA : les chromocentres et le nucléoplasme ne retiennent plus alors le colorant ; par contre le nucléole reste coloré, ce qui peut indiquer la présence de protéines basiques non liées,
2° soit en hydrolysant les histones, après traitement au TCA, par HCl 0,2 N pendant 3 heures, à 20° C : les noyaux et les nucléoles perdent alors souvent leur affinité pour le vert solide FCF, mais les résultats sont irréguliers .

IV - TECHNIQUES HISTOAUTORADIOGRAPHIQUES .

La détermination des premières réactions métaboliques après la séparation des explantats ou la détermination du laps de temps indispensable à l'établissement du premier cycle mitotique dans le cas de Begonia rex a nécessité l'utilisation des substances suivantes, marquées par le tritium (Service des Molécules Marquées du CEA-Saclay) :

A - Thymidine ^3H -6 (TMM 48 B) en solution aqueuse stérile d'une activité spécifique de 16 Ci/mM, utilisée à la dose de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de solution appliquée .

B - Uridine ^3H -5 (TMM 85 B) en solution aqueuse stérile d'une activité spécifique de 5 Ci/mM, utilisée à la dose de 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de solution appliquée .

C - L-lysine ^3H -4(n) (TMM 113), sous forme de chlorhydrate, d'une activité spécifique de 15 Ci/mM, utilisée à la dose de 3 $\mu\text{Ci/ml}$ de solution appliquée .

La fixation des échantillons traités a été faite comme précédemment. Les lames portant les coupes ont été soigneusement rincées à l'eau courante pendant 24 à 48 heures de façon à éliminer le plus possible la substance radioactive non fixée, puis dans l'eau distillée avant l'application d'émulsion nucléaire liquide Ifford K₅. Le temps d'exposition a été déterminé par une expérience préliminaire; il a été de 10 jours pour la thymidine, de façon à obtenir un marquage net caractérisant la phase S de synthèse de l'ADN, de 4-5 jours pour l'uridine, ce qui permet un comptage des grains, et de 5 jours pour la lysine. Les autohistoradiographies ont été développées suivant le processus classique (Jensen, 1953) et les coupes ont été post-colorées par l'hémaluméosine de Mayer, méthode de coloration sommaire qui n'avait d'autre but que de repérer nettement les noyaux. Les observations ont été faites par l'exploration systématique des coupes situées dans la zone de morphogenèse (150 coupes au moins par échantillon), et sur 3 échantillons au minimum par traitement. Les observations de Bernier et Bronchart (1963) montrent que la circulation de la thymidine tritiée est difficile et que l'application doit être faite au point où le métabolisme s'établit. C'est la raison pour laquelle la partie à étudier a été mise directement au contact de la substance (3 ml dans un petit bécher) pendant un temps variable, qui sera précisé ultérieurement et

qui est fonction à la fois des problèmes à résoudre et du corps chimique à incorporer .

V - TECHNIQUES D'EXTRACTION, CHROMATOGRAPHIE ET TESTS BIOLOGIQUES DES SUBSTANCES DE CROISSANCE .

A - Substances actives sur le test mésocotyle d'avoine :

Les feuilles de Begonia rex sont découpées sur les nervures principales en fragments d'environ 3 x 2 cm (10 feuilles par répétition). Au moment voulu, les extrémités proximales et distales sont prélevées (carrés de 5 x 5 mm) à la chambre froide, jetées immédiatement dans l'azote liquide et lyophilisées pendant 48 heures. Les échantillons sont conservés sous vide en dessiccateur à l'obscurité en présence de chlorure de calcium et d' "actigel" jusqu'à l'utilisation. Pour chaque échantillon, 200 mg en poids sec (rapport poids sec sur poids frais : environ 1/8) sont broyés 3 fois dans un homogénéiseur de verre "Potter" avec 15 ml de méthanol absolu, redistillé et glacé, pendant 20 minutes, dans un bain de glace. Les trois extraits sont groupés et évaporés sous vide à la température de 25° C dans un évaporateur rotatif, puis le tout est repris par 1/2 ml de méthanol et déposé sur une bande de papier Whatman 3 MM et 3 cm de large. Le mélange chromatographique est constitué par l'isopropanol (80), l'ammoniaque à 28 % (0,05) et l'eau (20). Après équilibration sans contact (8 heures), la partie inférieure de la bande est plongée dans le solvant qu'on laisse monter jusqu'à 20 cm au-dessus de la ligne de départ (10 heures à 15°). Après séchage, le chromatogramme est découpé en bandes de 1 cm de large entre les Rf 0 et 1. Chaque bande est testée par le test mésocotyle d'avoine de Nitsch et Nitsch (1956), en présence d'une gamme témoin d'AIA (1, 3, 10, 30, 100 µg/l). 2 répétitions ont été faites par expérience. La valeur statistique de la méthode a été éprouvée par Harada (1962) en comparant soit des gammes témoin, soit plusieurs répétitions d'un même extrait : les résultats sont reproductibles, si on

admet un seuil de probabilité de 20 % (analyse de variance par le test F de Fischer), ce qui montre une certaine variabilité du test. D'autre part, l'élongation des segments de mésocotyles d'avoine est sensiblement proportionnelle au logarithme de la concentration entre 1 $\mu\text{g/l}$ et 500 $\mu\text{g/l}$; il y a au delà rupture de pente et même inhibition par toxicité (Gandar, 1962). Les résultats obtenus n'ont pas été exprimés en équivalents AIA . On sait que cette méthode d'expression est très critiquable dans la mesure où une région donnée du chromatogramme peut contenir plusieurs substances dont les quantités varient avec le moment de l'extraction et dont les interactions ne sont pas prévisibles. D'autre part, la courbe d'action d'une autre auxine peut être très différente de celle d'AIA. Il vaut donc mieux juger des résultats en fonction du sens des variations (Gandar, 1962) .

B - Substances ayant l'activité des cytokinines .

La méthode d'extraction de ces substances a été adaptée pour chaque matériel, elle est exposée dans le texte. Deux tests biologiques ont été utilisés :

1 - Le test moelle de tabac dérivé de celui de Jablonski et Skoog (1954) .

Le milieu est celui de Murashige et Skoog (1962). Des cylindres de 5 mm de diamètre et de 5 mm de longueur sont prélevés aseptiquement dans la moelle de tiges de tabacs "Wisconsin 38" élevés en jours courts . Ils sont déposés horizontalement sur le milieu ; en présence de sucre (3 %) et d'AIA (1mg/l) ; ils prolifèrent quand le milieu contient une cytokinine. Les pesées des cultures sont faites après 3 semaines, en poids frais et en poids sec. Ce test doit être considéré comme qualitatif et grossièrement quantitatif (il est assez variable dans ses réponses quantitatives). Il est bon de noter l'aspect des cultures, certaines indications pouvant être déduites quant à la présence simultanée de substances stimulant la division (de type cytokinine) et d'inhibiteurs. Au moment du prélèvement, chaque explantat pèse 84 mg en poids frais et 3 mg de poids sec en moyenne. Une expérience faite sur 4 semaines de culture montre

qu'il est indispensable de raisonner sur le poids sec, meilleur critère de la croissance et de la division cellulaire :

Concentration de kinétine en $\mu\text{g/l}$	0	10	30	50	100	200
Poids frais moyen d'un explantat en mg	200	779	1169	1269	1013	958
Poids sec moyen d'un explantat en mg	12,3	52,6	68,0	81,9	82,0	73,2

On adopte la kinétine comme substance de référence aux concentrations de 10 et 100 $\mu\text{g/l}$. Au delà de 100 $\mu\text{g/l}$, un effet de toxicité peut se manifester. Pour éviter une trop grande hétérogénéité des prélèvements de moelle, il est bon d'éliminer la base et la partie supérieure de la tige, de façon à ne conserver que la partie moyenne ; enfin on mélange les explantats avant de les planter. Il y a, en effet, dans la moelle de tabac (Lavee et Galston, 1968) des gradients structuraux, physiologiques et biochimiques qui peuvent modifier la réponse des explantats aux substances stimulatrices .

2 - Le test Amarante (Bigot, 1968)

La nécessité pour le test moelle de tabac d'incorporer dans le milieu une grande quantité d'extrait végétal nous a obligé à rechercher une caractérisation de l'activité cytokinique par une méthode moins exigeante. Bamberger et Conrad (1966) montrent qu'en présence d'un précurseur, la tyrosine, la kinétine stimule la synthèse des beta-cyanines dans les cotylédons et l'hypocotyle de certaines espèces d'Amaranthus, en particulier A. caudatus . Cette propriété peut être utilisée pour mettre en évidence des substances de type cytokinine, à condition de montrer sa spécificité. Notons qu'un effet semblable est noté dans les cultures de tissu d'Haplopappus (Gamborg et collab. , 1970) et dans les plantules de Portulaca grandiflora (Hirsch, 1968) .

Les dérivés suivants de l'adénine ont alors été essayés : 6-benzyl-aminopurine, 6-furfurylaminopurine, zéatine, isopentenyladénine, 6-benzyl-9-tétrahydropyrane-amino-purine (SD-8339), 6-méthyl-adénine (mises en solution dans de l'eau acidulée par HCl 0,1 N, le pH étant ramené ensuite à 5,5). Les solutions ont été incorporées au milieu avant l'autoclavage, de façon à obtenir une concentration finale de 30, 100 ou 1000 µg/litre .

La méthode préconisée par Kohler et Conrad (1966) a d'abord été exactement suivie (72 heures de contact avec les substances, pendant lesquelles une illumination de 4 heures est donnée, puis diffusion libre dans l'eau des bétacyanines, après congélation de 50 plantules). Les mesures ont été faites avec un photolorimètre Coleman. Les résultats (4 expériences), exprimés par la figure 1 de la planche XXXX montrent que toutes les adénines substituées reconnues comme ayant, à divers degrés, une action de type cytokinine stimulent la synthèse des bétacyanines en présence de tyrosine. L'adénine et la méthyladénine, par contre, sont inactives. Comme dans d'autres tests, aux faibles concentrations, l'activité de la zéatine est supérieure à celle des autres cytokinines. Ces substances produisent une inhibition importante de la croissance de l'hypocotyle. Cette inhibition n'apparaît pas dans le cas du témoin ou des plantes traitées par l'adénine ou la 6-méthyladénine .

La méthode préconisée par Kohler et Conrad ne permet pas de déceler moins de 30 µg/litre de kinétine, substance habituellement prise comme référence. Pour améliorer la sensibilité du test, il est nécessaire de diminuer le niveau de synthèse des bétacyanines du témoin. Ce résultat a été obtenu en supprimant toute illumination pendant la période de contact des plantules avec les substances à tester. Le protocole d'expérimentation proposé est le suivant :

- a. Désinfection des graines par un filtrat d'une suspension d'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 5 minutes, puis rinçage à l'eau stérile (3 fois) .
- b. Semis en boîtes de Petri, en conditions stériles, sur 2 épaisseurs de

papier filtre Whatman N° 1, imbibé d'eau distillée stérile ; un fragment d'éponge stérilisée permet de maintenir l'humidité à saturation. De façon à constituer des lots de plantules homogènes, il est conseillé de semer 100 à 150 graines par boîte .

c. Germination pendant 48 heures à l'obscurité complète, à la température de 22° C .

d. Repiquage de 50 plantules, constituant un lot homogène, sur milieu gélosé en boîte de Petri. Chaque boîte contient 10 cm³ d'un milieu de base dans lequel les substances à étudier sont incorporées : la formule de ce milieu est la suivante : tampon phosphate $\frac{M}{75}$ (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) à pH 6,3 : 100 ml ; tyrosine : 100 mg ; agar : 1 g. Chaque boîte ensemencée est immédiatement placée à l'obscurité .

e. Développement pendant 72 heures à l'obscurité complète et à 22° C.

f. Congélation de lots de 50 plantules dans 4 ml d'eau distillée, à -16° C.

g. Décongélation pendant 2 heures, puis deuxième congélation dans des conditions identiques. Cette technique améliore sensiblement la libre diffusion des pigments .

h. Décantation et rinçage des plantules par 1 ml d'eau distillée. Ajustement du volume final à 5 ml .

i. Mesure de l'absorption des diffusats au colorimètre, à la longueur d'onde de 542 mμ (maximum d'absorption pour les bétacyanines d'Amaranthus caudatus). Dans certains cas, une diffusion parasite provoque un trouble, augmentant sensiblement l'absorption. Il est donc indiqué d'éliminer cette cause d'erreur par une mesure annexe au minimum d'absorption de 620 mμ. Le résultat définitif est obtenu en retranchant les deux lectures .

Les résultats d'une série de onze expériences, portant chacune

sur un intervalle de concentrations de 3 à 1000 $\mu\text{g/l}$ de kinétine, sont représentés par la figure 2 de la planche XXXX .

La représentation graphique des résultats groupés en classes de faible effectif permet d'assimiler la distribution pour chaque concentration à la distribution normale. Le test F de Snedecor montre que les traitements pris dans leur ensemble sont hautement significatifs. Le test de Student pour les petits échantillons a permis de comparer les moyennes deux à deux dans le cas des concentrations les plus faibles ; par rapport au témoin, le traitement 3 $\mu\text{g/l}$ est significatif, tandis que les traitements 10 $\mu\text{g/l}$ et 30 $\mu\text{g/l}$ sont hautement significatifs. Les coefficients de variation sont acceptables dans ces expériences (tableau 2). Les principales causes d'erreurs dans ce test sont attribuées soit au manque d'homogénéité des lots de plantules pour les différents traitements, soit à la diffusion des pigments en milieu aqueux . Toutefois, cette méthode évite pour l'extraction la complexité d'un broyage suivi d'une filtration, nécessitant un rinçage sur filtre .

Cette étude a été complétée par quelques vérifications dont les résultats sont exposés ci-dessous :

a. Sont sans action : adénosine, ac. cytidylique, cytosine, guanine, guanosine, thymine, uracile, ac. urydylique (10 à 1000 $\mu\text{g/l}$), ac. indol-acétique, tryptophane (filtré), ac. gibbérellique (filtré), ac. abscissique (filtré), retardants de croissance (CCC, AMO 1618, B-995, Phospon D), diphénylurée (1 à 1000 $\mu\text{g/l}$) .

b. Sans tyrosine, la stimulation de la synthèse des bétacyanines produits par la kinétine est 10 fois plus faible .

c. Des concentrations de kinétine supérieures à 3000 $\mu\text{g/l}$ sont toxiques.

d. L'acide p-coumarique (10 à 100 mg/l), l'acide trans-cinnamique (10 à 50 mg/l), la phénylalanine (1 g/l) sont toxiques ou sans effet en

présence de kinétine 100 $\mu\text{g/l}$.

e. Des concentrations d'acide indolacétique ou d'acide gibbérellique supérieures à 30 $\mu\text{g/l}$ en présence de kinétine 100 $\mu\text{g/l}$ inhibent la synthèse des bétacyanines .

f. Aucune amélioration de la sensibilité du test n'est obtenue par l'allongement de la période de culture (5 jours) la modification du pH (5 à 8) ou l'utilisation de la variété tétraploïde d'A. caudatus .

g. Aucun résultat n'est obtenu avec le chou rouge ou la betterave rouge.

En conclusion : La synthèse des bétacyanines dans la plantule d'A. caudatus L. à l'obscurité, en présence de tyrosine, semble spécifique des adénines substituées dont l'action est analogue à la kinétine. Dans ce phénomène, les cytokinines remplacent l'action stimulante de la lumière. Elles s'opposent d'autre part à l'action étiolante de l'obscurité. Cette propriété peut être utilisée pour le dosage biologique de ces substances, avec une bonne sécurité à partir d'une concentration de 3 $\mu\text{g/l}$.

CHAPITRE IV

ESPECES VEGETALES ET CAULOGENESE : ETUDE COMPAREE
DES MODALITES DE LA NEOFORMATION EPIPHYLLE POUR QUELQUES
ESPECES .

Une étude physiologique précise nécessitera la connaissance la plus exacte possible des modalités de l'apparition des néoformations naturelles à partir du matériel végétal choisi. Seule cette connaissance permettra une interprétation motivée, par exemple, de l'action de composés fournis aux explantats à des moments choisis, ou encore de l'évolution du taux de substances endogènes. C'est donc dans cet esprit qu'une étude histologique a été entreprise pour quelques espèces : Peperomia griseo-argentea Yuncker, Lilium martagon L. et L.(x) "Enchantment", Begonia rex Putz .

I - ETUDE DYNAMIQUE DE L'APPARITION NATURELLE DE RACINES
ET DE BOURGEONS A PARTIR DE FEUILLES ISOLEES DE PEPEROMIA
GRISEO-ARGENTEA YUNCKER . (Bigot et Brulfert, 1968). (Pl. I, II, III).

Le bouturage des feuilles de Peperomia a été étudié succinctement dès 1883 par Beinling, puis par Harris et Hart en 1964. Les observations de ces derniers auteurs portent seulement sur des coupes au microtome à congélation, éclaircies au lactophénol et montées dans le bleu coton, méthode d'étude peu élaborée. Cette étude a donc été reprise d'une façon plus précise, avec l'espèce dont l'enracinement est le plus rapide, parmi celles qui ont été essayées, Peperomia griseo-argentea Yuncker. Des

feuilles sensiblement de même âge ont été prélevées sur 10 plantes élevées en jour naturel et initiées à la floraison. Ces feuilles, sectionnées à 1 cm environ de l'insertion pétioleaire, ont été placées en boîte de Petri, dans les conditions décrites précédemment. Deux expériences ont été réalisées. Tous les 2 jours, par lot de 10 échantillons, on a fixé des fragments de feuille pris au niveau des nervures principales sectionnées. La coloration d'Unna a été utilisée ; la spécificité a été contrôlée par le test de Brachet.

Les résultats de ces observations sont les suivants :

1. En ce qui concerne la structure de la feuille de Peperomia (Pl. I, fig. 1), le fait le plus saillant consiste en la présence d'un hypoderme de 1 à 2 assises de cellules géantes de type palissadique, largement vacuolisées, situées du côté de la face supérieure. Un montage dans un liquide isotonique confirme l'absence de chloroplastes dans ces cellules ; ces organites sont localisées principalement dans la première assise du parenchyme du limbe. Le cambium ne peut être décelé nettement. Aucune ébauche préexistante n'est visible au moment de la séparation .

2. Après 2 jours (Pl. I, fig. 2 et 3), on note une augmentation du volume nucléolaire dans les premiers 1000 μ adjacents à la blessure, tant dans le parenchyme foliaire que dans le liber, s'accompagnant d'une nette reprise de la colorabilité à la pyronine par rapport au stade initial. Ces deux phénomènes diminuent d'intensité lorsqu'on s'éloigne de la zone blessée. Des figures de mitoses annoncent dans le parenchyme la mise en place des assises de cicatrisation. Deux zones latérales libériennes présentent un cytoplasme pariétal très colorable et déjà quelques prophases et métaphases : ces deux régions constituent le lieu d'initiation des futures racines néoformées .

3. Après 4-5 jours (Pl. I, fig. 4), la colorabilité à la pyronine est devenue très forte dans les territoires périlibériens précédemment cités ; les mitoses y sont fréquentes ; par contre, aucune structuration n'est visible. La zone de cicatrisation est en place .

4. Après 7 jours (Pl. II, fig. 1 et 2), le passage à la phase organogène des méristèmes de racines est visible ; il faut noter que ces néoformations sont situées à la limite de la zone cicatricielle. Il n'y a , à ce stade, aucune formation caulinaire .

5. Après 12 jours, la croissance des racines est amorcée. La liaison vasculaire avec les formations conductrices foliaires est en voie d'établissement. Deux échantillons montrent une reprise de colorabilité par la pyronine (nucléole et cytoplasme) au niveau de l'insertion des racines sur le faisceau conducteur de la nervure. Dans ce cas il semble que le faisceau libérien pourrait être en partie impliqué dans ce phénomène, ce qui indiquerait alors une origine mixte pour la formation caulinaire dans cette espèce. Cette réactivité est l'annonce d'un territoire d'initiation caulinaire .

6. Après 14 jours, les méristèmes caulinaires sont entrés dans la phase histogène : ils sont toujours étroitement liés à la base de la racine néoformée ; toutefois il se confirme pour certains cas que le liber de la feuille-mère peut jouer un rôle au **m**oment de leur initiation .

7. Après 16 jours et dans les jours suivants, les bourgeons commencent leur développement toujours liés à la racine néoformée (Pl. II, fig. 3 ; Pl. III, fig. 1 et 2). Quelquefois, le liber, toujours dans la région de l'insertion des racines, forme une expansion réduite qui porte des néoformations caulinaires de 2ème génération. La structuration du méristème suivie de la production d'une ébauche foliaire est visible au bout de 22 jours (Pl. II, fig. 4). Par la suite, l'apparition de racines adventives au niveau des bourgeons rendra autonome chaque jeune plante.

En conclusion, il se manifeste chez le Peperomia griseo-argentea une aptitude naturelle précoce à la néoformation des racines à partir de fragments foliaires isolés : il est notable que, dès le 2ème jour après la

séparation de la plante-mère, l'induction des mitoses périlibériennes menant à l'organisation de méristèmes de racines soit réalisée du côté de la section proximale, en des points peu éloignés de la zone cicatricielle. Cette induction est précédée et accompagnée d'une forte synthèse d'acides ribonucléiques, mesurée par une nette reprise de coloration cytoplasmique et nucléolaire par la pyronine. La caulogenèse, plus tardive, est très dépendante de la rhizogenèse : en effet les bourgeons néoformés sont liés à la base de la racine ; une expérience, effectuée par ailleurs, confirme cette dépendance : un traitement par la benzylaminopurine (concentration 10^{-4} M/litre, incubation des fragments pendant 24 heures seulement, obscurité, 22° C) provoque l'inhibition complète de la rhizogenèse à partir d'explantats foliaires de diverses espèces de *Peperomia* ; cette substance, habituellement très stimulante du bourgeonnement, n'entraîne pas l'apparition de bourgeons au niveau des nervures . Ce résultat semble confirmer le fait observé que la racine est indispensable à l'induction des bourgeons dans le genre *Peperomia*. L'effet d'un tel traitement est fortement rémanent et les explantats restent en vie pendant plus de 5 mois sans produire aucune néoformation. D'autre part, un traitement de 24 heures par l'acide naphthalène-acétique à concentration de 10^{-5} M, donné aussitôt le prélèvement, stimule fortement la rhizogenèse et corrélativement, la caulogenèse ; ceci est en accord avec les faits précédents .

Il ressort de cette étude que le *Peperomia* ne peut être envisagé comme matériel d'expérimentation pour l'étude de l'initiation de la néoformation des points caulinaires. Toute action pharmacodynamique précoce agira en effet d'abord sur la rhizogenèse, l'inhibition de la formation des racines entraînant l'inhibition de la caulogenèse. Toutefois, on pourrait envisager un processus expérimental laissant dans un premier temps les racines se former naturellement, pour, dans un 2ème temps, appliquer certains facteurs physiques ou chimiques pouvant influencer sur l'apparition des bourgeons . Cette méthode, qui n'a pas été suivie ici, pourrait éclaircir éventuellement les relations existant entre la racine et

ses bourgeons. Quelques expériences pharmacodynamiques seront néanmoins rapportées dans le Chapitre VII .

II - ETUDE SUCCINCTE DE L'APPARITION NATURELLE DE BOURGEONS CHEZ QUELQUES ESPECES DE LILIUM .

Si on se réfère aux travaux de Hagemann (1934), les monocotylédones présentent moins de possibilités de régénération par isolement d'organe que les Dicotylédones. Toutefois, un certain nombre de Liliacées forment des bourgeons à partir des feuilles vertes, en particulier certaines espèces de la tribu des Scillées : Chouard (1930, 1931, 1933, 1935) souligne l'origine épidermique des bourgeons néoformés et l'incapacité pour les feuilles d'Endymion non scriptus L. (*E. nutans*) de produire des racines, ces derniers se différenciant dans la zone du plateau des bulbilles néoformées. Buvat (1950) confirme ces résultats sur Brimeura amethystina Salisb (Hyacinthus a. L.). En pratique horticole, l'obtention des Lilium par bouturage des écailles tubérisées est un phénomène connu. Des études histologiques ont été entreprises par Walker (1940), Godden et Watson (1962) et, plus récemment, par Rivière (1967). Les auteurs soulignent encore la reprise d'activité précoce des cellules épidermiques et sous-épidermiques qui sont à l'origine des néoformations caulinaires et l'absence de rhizogenèse à partir de l'écaille-mère. Les racines apparaissent après la liaison vasculaire entre le bulbille et les cordons vasculaires de l'écaille-mère, à partir d'une zone interne proche des formations conductrices de bourgeon, sans aucune liaison avec l'écaille-mère. Le phénomène primaire est donc bien ici l'apparition de bourgeons au voisinage de la zone de cicatrisation et à proximité des faisceaux conducteurs de l'écaille .

A - CHOIX DU MATERIEL .

Cette étude, réalisée pour quelques espèces ou hybrides

a d'abord été faite de façon à choisir un matériel convenable (Tableau 3). Pour leur réponse précoce et vigoureuse, Lilium martagon et L.(x) "Enchantment" ont été conservés pour l'expérimentation. Toutefois, du point de vue expérimental, l'étude des inhibiteurs du bourgeonnement se trouve limitée par le petit nombre des bulbilles apparaissant sur les écailles (2 en moyenne), comme l'ont noté les auteurs précédemment cités .

B - MODALITES MACROSCOPIQUES DE L'APPARITION DES NEOFORMATIONS .

Ces modalités sont les mêmes pour les 2 espèces. Toutefois, le bulbe écailleux du Lis martagon comporte d'habitude 3 années de végétation (Pl. IV, fig. 1 et 2) (développement sympodique). Il existe donc des écailles d'âges différents que l'on peut séparer par des critères morphologiques, ce qui a été fait dans cette étude de façon à savoir si les réaction vis-à-vis de la néoformation d'organes n'étaient pas perturbées par l'âge de l'écaille. En général, les bulbes sont maintenus en repos végétatif pendant la période hivernale à la température de 4° C et à l'obscurité. Un 2ème type d'étude possible de l'impulsion morphogénétique peut être fait au fur et à mesure de la reconstitution du bulbe. Ceci a été réalisé pour le Lilium (x) "Enchantment" et sera rapporté dans le chapitre consacré à l'isolement des substances endogènes. On notera que :

1. Les modalités d'apparition des ébauches néoformées sont les mêmes quelque soit l'âge de l'écaille, mais les écailles les plus jeunes ont un certain retard par rapport aux plus âgées .

2. Après 7 jours, un bourrelet méristématique est nettement visible au niveau de la section proximale, témoignant d'une activité mitotique intense. On n'observe pas cette modalité au niveau de la section distale. Il faut donc souligner que si le phénomène de blessure joue un rôle important dans la reprise et le maintien de l'activité mitotique, il ne peut être le seul à l'expliquer .

TABLEAU 3 - Bourgeonnement sur les écailles isolées de quelques espèces ou variétés de Lilium
(Les conditions de culture sont celles exprimées dans le chapitre matériel et techniques)

Espèces et variétés	2 semaines après la séparation			5 semaines après la séparation		
	vigueur des bourgeons apparus sur l'écaille-mère	formation de racines à partir de l'écaille-mère	polarité de bourgeonnement	vigueur des bourgeons apparus sur l'écaille-mère	formation de racines à l'apparus sur l'écaille-mère	polarité de bourgeonnement
Lilium amabile (1)(2)(4)	+	0	+ -	+++ (hétérogène)	0	+ -
- hybride Burgundy (1)	0	0	0	++ (nb points de caulogénèse)	0	+
- candidum	+	0	+	++++	0	+
- (x) Enchantment (midcentury hybrids)	++	0	+	++++	0	+
- martagon (2)	++	0	+	++++	0	+
- hybride Paisley strain (3)(4)	+	0	+ -	+++	0	+ -

- (1) Pour ces 2 espèces, on note que la rhizogénèse adventive au niveau des points caulinaires peut être très vigoureuse et ralentir considérablement la croissance des bourgeons (compétition possible entre les 2 formations) .
- (2) Après quelques écailles, les méristèmes néoformés donnent naissance à des feuilles vertes, pétiolées, dont la gaine tubérisée participe à l'édification des bulbilles .
- (3) Aucune feuille verte ne se forme à partir de bourgeonsnnéoformés pendant la période d'observation (3 mois)
- (4) Quelques bourgeons apparaissent soit au milieu de l'écaille, soit sur les bords de l'écaille . La polarité est donc moins stricte pour ces 2 variétés .

3. Après 15 à 20 jours, les méristèmes caulinaires sont présents sur le bourrelet, le plus fréquemment au nombre de deux, placés latéralement. Le dôme méristématique est entouré de 2 ébauches écailleuses.

4. Après 5 semaines (Pl. III, fig. 2), la rhizogenèse s'est manifestée pour les bulbilles les plus vigoureuses, au niveau du plateau, indépendamment de l'écaille-mère. Trois à quatre écailles sont alors formées.

5. Par la suite, le méristème du bulbille forme 2 ou 3 écailles supplémentaires, puis des feuilles vertes dont la gaine participe à l'édification du bulbille ; 1 ou 2 racines nouvelles sont initiées, non ramifiées .

On doit remarquer que, si la néoformation des bulbilles s'effectue aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, par contre la différenciation des limbes chlorophylliens nécessite strictement la lumière pour cette espèce, dans les conditions de l'expérience et après 6 mois de développement ; on notera aussi qu'il n'y a jamais de néoformation de point caulinare donnant naissance à une tige feuillée, mais établissement d'abord d'un stade tubérisé spécifique, puis apparition de feuilles juvéniles comme on les observe dans la germination (qui a été étudiée au même stade) .

C - MODALITES MICROSCOPIQUES DE L'APPARITION DES NEOFORMATIONS .

Les modalités microscopiques, succinctement étudiées, confirment les résultats des auteurs précédents :

1. Au moment du prélèvement (Pl. IV, fig. 2), aucune ébauche préexistante n'a été discernable. L'écaille comporte :

- 2 épidermes dont les cellules sont cutinisées vers l'extérieur, dépourvues

d'amidon, à stomates peu nombreux (les cellules stomatiques sont amylières) .

- Un parenchyme de réserve homogène, sans formation de soutien dont les cellules sont bourrées de grains d'amidon de tailles et de forme diverses.
- 7 faisceaux cribro-vasculaire d'importance et de structures diverses comme le montre la figure 2 de la planche IV. Le xylème est généralement peu développé . C'est au niveau des faisceaux F_2 paralatéraux que se forment habituellement les ébauches, mais rien ne laisse prévoir cet évènement d'un point de vue histologique .

2. Après 7 jours de développement (Pl. V), on note :

- l'apparition d'une zone nette de cicatrisation, isolant la zone de blessure dont les cellules sont nécrosées .
- la présence, du côté proximal, de quelques divisions périclines, la plupart du temps dans l'assise sous-épidermique, rarement dans l'épiderme .
- l'absence de divisions cellulaires profondes ; cependant les cellules de la partie proximale de l'écaille sont en voie de dédifférenciation active . En particulier les grains d'amidon sont hydrolysés ou souvent réunis autour du noyau lorsque le bouturage s'effectue à la lumière (Pl. VIII, fig. 4) .
- l'absence de divisions sous-épidermiques soit du côté distal, soit du côté de la face dorsale de l'écaille .

En conclusion, les premières mitoses sous-épidermiques annoncent l'apparition des néoformations après 7 jours du côté proximal, mais aucune cellule n'est plus particulièrement à l'origine des futurs bulbilles, fait défavorable à une étude précoce de l'initiation des points caulinaires.

3. Après 15 jours de développement (Pl. VI et VII), on peut

apporter les précisions suivantes :

- il n'y a pas extension de la zone de cicatrisation qui se limitera donc à 2 ou 3 assises cellulaires .
- l'impulsion mitotique a gagné les cellules profondes qui se sont multipliées activement, particulièrement au niveau des faisceaux F_2 comme le montre la planche VII. L'orientation des divisions est indécise et le massif cellulaire reste inorganisé. Toutefois dans l'axe des faisceaux F_2 se dessine assez profondément une calote méristématique qui pourrait annoncer la naissance des bulbilles paralatéraux (Pl. VII, fig. 1). Les divisions diminuent d'intensité de part et d'autre de ces massifs. Il y a constitution d'un bourrelet méristématique proximal .
- La zone de dédifférenciation est beaucoup plus développée et peut gagner la partie dorsale de l'écaille. Toutefois aucune mitose n'y est décelable .
- Il apparaît clairement que la dédifférenciation cellulaire s'établit progressivement, témoignant ainsi d'une induction provenant de la partie proximale au niveau de laquelle la réaction de morphogenèse est amorcée.
- les cellules très éloignées de la zone de mitose restent complètement inertes .

4. Après 20 jours, les méristèmes apicaux des bulbilles sont en place et sont fonctionnels (1 ou 2 écailles formées) ; des cordons vasculaires s'amorcent reliant l'ébauche aux formations conductrices de l'écaille (Pl. VIII, fig. 1 à 3). La rhizogenèse s'effectue tardivement après 1 mois au niveau de la base du bulbille (plateau futur), indépendamment de l'écaille (Pl. III, fig. 3). Avec l'espèce Lilium (x) "Enchantement", les modalités sont sensiblement les mêmes, mais la formation des bulbilles est plus rapide. (Pl. IX) .

En conclusion, on retiendra essentiellement les points suivants de cette brève étude :

- a. aucune cellule spécialisée n'est à l'origine des bourgeons, bien que ceux-ci aient une certaine propension à apparaître sur les bords de l'écaille. Il est donc impossible de suivre plus particulièrement une cellule ou une autre au cours de la morphogenèse .
- b. le nombre de bourgeons formés par écaille est relativement faible, ce qui rend plus difficile une utilisation significative des inhibiteurs de la morphogenèse .

Il en résulte que ces espèces ne constituent pas un matériel très satisfaisant pour une étude métabolique et cytologique précise du bourgeonnement. Toutefois quelques expériences supplémentaires ont été faites et sont rapportées ci-dessous .

D - Evolution de l'aptitude à bourgeonner chez les organes d'origine foliaire de *Lilium* (x) "Enchantment" .

Nous avons cherché à connaître l'évolution de l'aptitude à bourgeonner au cours du développement pour les organes d'origine foliaire . Les difficultés d'approvisionnement en bulbes de *Lilium martagon* et l'inconvénient expérimental présenté par l'hétérogénéité des écailles nous ont incité à choisir le *Lilium* (x) "Enchantment" comme matériel d'étude. Toute tentative de bouturage des feuilles aériennes en boîtes de Petri a été un échec complet. Nous avons alors étudié leur comportement en milieu gélosé en comparaison avec celui des écailles. Puis nous avons étendu l'étude aux pièces florales (que l'on a l'habitude de considérer comme ayant une origine foliaire) .

1. Cas des feuilles isolées . (Pl. X) .

Les prélèvements ont été effectués sur des jeunes tiges (10 cm de longueur) après la levée de dormance végétative par le froid (4 mois à 2-4° C) à l'obscurité. Les dernières écailles formées, les 4-5 premières feuilles dont la base est légèrement tubérisée et les feuilles

de la tige (à partir de la 10ème feuille) ont été soigneusement séparées . La désinfection du matériel végétal a été faite par l'hypochlorite de calcium (70 g/litre, suspension filtrée) pendant 20 minutes après paraffinage des blessures ; le milieu utilisé a été celui de Murashige et Skoog sans ou avec substances de croissance dont la combinaison la plus favorable a été déterminée dans une expérience préliminaire : ANA 10^{-6} M + BA 10^{-5} M^{*}. Les écailles ont été disposées à plat sur le milieu, la section proximale étant repérée par rapport au tube de culture ce qui permet de juger de la polarité, alors que les feuilles ont été placées verticalement. Les résultats sont exprimés dans le tableau 4.

La lecture de ce tableau fait apparaître que l'aptitude naturelle à bourgeonner se perd au moment de la différenciation des feuilles aériennes chez cet hybride de Lilium : elle semble donc liée à l'état tubérisé . La combinaison hormonale utilisée, qui s'oppose à la sénescence des feuilles, stimule le bourgeonnement sur toutes les catégories d'organes foliaires, trouble inégalement la polarité de morphogenèse dans le cas des écailles, sans toutefois provoquer la généralisation du bourgeonnement sur les feuilles de la tige . D'autre part, si les écailles et les feuilles inférieures à base tubérisée forment des bulbilles, les feuilles de la tige, par contre, ont tendance à donner à la lumière et quand elles sont stimulées à la néoformation, des bourgeons formant plus rapidement des feuilles aériennes chlorophylliennes .

2. Cas des pièces florales. (Pl. XI et XII) .

Cette étude a été mise en place d'une part pour connaître les potentialités de néoformation de bourgeons à partir des pièces florales (dont la structure foliaire est communément admise), d'autre part pour **tenter** d'obtenir des embryons haploïdes à partir du pollen. L'enracinement de pièces florales isolées (y compris les ovaires) a fait l'objet de plusieurs études (Carrière en 1877, La Rue en 1942 et 1954, Nitsch en 1949 et 1951). Mais, à notre connaissance, aucune apparition de bourgeons n'a été

* ANA : acide naphthalène acétique , BA : benzylaminopurine ; M : concentration molaire par litre .

TABLEAU 4 - Comparaison de l'aptitude à la néoformation de bourgeons des écailles et feuilles de Lilium (x) "Enchantment" (milieu de Skoog sans ou avec combinaison hormonale ANA 10⁻⁶ M + BA 10⁻⁵ M - 2 mois de culture - 24° C - 16 h d'éclairement par des tubes Mazda Fluor blanc industrie de 40 W, placé latéralement, en moyenne 1500 lux) .

	Milieu témoin				Milieu enrichi en hormones (ANA 10 ⁻⁶ M+BA 10 ⁻⁵ M)			
	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre de bourgeons/explantat (total des explantats)	Nombre d'explantats dépolarisés	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre de bourgeons/explantat (total des explantats)	Nombre d'explantats dépolarisés
Dernières écailles formées	19	19	2,8	0	21	21	4,3	7
Premières feuilles formées (à base tubérisée)	19	14	1,8	-	18	16	3,4 ⁽¹⁾	-
Feuilles de la tige (à partir de la 10ème feuille formée)	27	1	ξ	-	28	7	0,9	-

(1) Au moment de la lecture, de nombreux points caulinaires sont en voie de différenciation du côté de la section proximale mais ne se développeront pas .

signalée. L'obtention d'embryons haploïdes à partir de grains de pollen constitue un domaine récent d'investigation concernant les potentialités de morphogénèse des végétaux supérieurs, domaine exploré par plusieurs auteurs : Guha et Maheshwari (1966) ; Bourgin et Nitsch (1967) ; Nakata et Tanaka (1968) ; Nitsch, Nitsch et Hamon (1968) ; Nitsch et Nitsch (1969).

Afin de ralentir le cycle de développement (de façon à permettre des prélèvements étagés des boutons floraux) les plantes sont maintenues en température fraîche (12° C le jour et 8° C la nuit), en journée de 16 heures avec lumière d'appoint, dans les salles claires du Phytotron et Gif-sur-Yvette, et alimentées par un arrosage bihebdomadaire avec de la solution nutritive. Ces conditions de cultures ont permis une floraison abondante. Les stades retenus pour le prélèvement des échantillons sont :

a - boutons de 0,7 à 1 cm - anthères peu développées, vertes - ovaire à peine formé (0,5 cm environ) - tépales verts .

b - boutons de 2 à 3 cm - anthères développées, vertes - ovaires en voie de développement (2 cm environ) - tépales verts .

c - boutons de 3 à 5 cm - anthères de couleur orange, à maturité, ovaire de 1,5 à 2 cm - tépales vert jaune à jaune orangé .

d - enfin, réceptacles après chute des pièces florales, autres que l'ovaire .

Les boutons après paraffinage de l'extrémité du pédoncule, sont désinfectés par le filtrat d'une suspension d'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 10 minutes. Après un rinçage à l'eau stérile, les pièces sont prélevées aseptiquement et ensemencées sur milieu gélosé, horizontalement ou verticalement. Les ovaires sont tronçonnés aux deux extrémités ; les réceptacles isolés ont été disposés dans tous les cas en position normale. Les cultures ont été placées à une température moyenne de

de 25° C, dans les conditions d'éclairement déjà indiquées .

Le milieu de Lin et Staba a donné, dans cette expérience, de meilleurs résultats que le milieu de Murashige et Skoog .

La morphogenèse a été stimulée par des substances de croissance de synthèse : une auxine, l'acide naphthalène-acétique (ANA) et une cytokinine, la benzylaminopurine (BA) à la concentration de 10^{-6} M et 10^{-5} M. Parmi les combinaisons de ces deux substances, le mélange BA (10^{-5} M) + ANA (10^{-6} M) s'est avéré le plus approprié pour maintenir en survie les pièces isolées .

Au cours des expériences préliminaires, nous avons noté que les tépales immatures, les filets avec les anthères, les anthères isolées, les styles et les stigmates sont restés inertes. Par contre les filets isolés et les ovaires ont donné un faible pourcentage de bourgeonnement, toujours polarisé à la base morphologique des pièces. L'utilisation d'autres cytokinines ou de l'adénine n'a pas amélioré ces résultats. Dans tous les cas, le témoin sans substance de croissance a dépéri rapidement. La polarité de formation des quelques bourgeons apparus nous a incité à penser qu'un fragment de réceptacle pouvait être entraîné avec la pièce florale et que la caulogenèse serait liée à celui-ci .

Les réceptacles ont alors été prélevés aux divers stades de développement du bouton floral sommairement décrits plus haut; les pièces florales ont été séparées avec soin. Les conclusions sont les suivantes :

a. Les réceptacles isolés (Pl. XI, fig. 3) avec le pédoncule, sont capables de bourgeonner très activement et rapidement (15 jours) pour le stade 1. La vigueur décroît au fur et à mesure du vieillissement, et la morphogenèse s'annule après la chute naturelle des pièces florales.

Ainsi, avec la combinaison : ANA (10^{-6} M) + BA (10^{-5} M), on observe dans une expérience :

Stade 1 : 10 réceptacles bourgeonnent sur 12 et produisent 25,6 bourgeons par explantat .

Stade 2 : 7/12 avec 15,2 bourgeons en moyenne par explantat .

Stade 3 : 1/12 .

Stade 4 : 0/12 .

Pour le cas du stade 1, on note l'apparition de bulbill~~es~~ sur la face racinaire en contact avec le milieu (Pl. XI, fig. 1). Le phénomène ne s'est pas produit aux ^{autres} stades, ce qui peut être en liaison avec l'acquisition d'un état de maturité plus avancée .

b. Les réceptacles isolés dépourvus de pédoncule ont mieux bourgeonné que les réceptacles avec pédoncule (11/12 avec la combinaison ANA (10^{-6} M) + BA (10^{-5} M), 16,3 bourgeons par réceptacle et 9/12 avec BA (10^{-5} M) pour le stade 3). Une prolifération nette s'est manifestée au niveau du réceptacle avec la BA (10^{-5} M) ; le réceptacle se révèle ainsi être une zone active de division cellulaire ; les tentatives pour maintenir le cal en culture ont échoué , mais des bourgeons sont apparus sur ces proliférations. (Pl. XI, fig. 2, et Pl. XII, fig. 1) .

c. Les pédoncules floraux seuls, les filets staminaux, les ovaires ont rapidement dépéri avec le milieu sans substance de croissance ou contenant de l'acide naphtalène-acétique ; par contre, ces derniers se sont maintenus en survie plus de 2 mois avec la benzyladénine ou une combinaison des 2 substances. En aucun cas, il n'a été observé de formation de bourgeons .

Il apparaît donc clairement que des potentialités de néoformation de bourgeons sont latentes au niveau des réceptacles floraux. A la suite de ces observations, il a été tenté de préciser le lieu de formation

des ébauches sur des réceptacles isolés sans pédoncule en présence de BA (10^{-5} M) et ANA (10^{-6} M). Les principales observations (faites sur 12 tubes) se résument ainsi (Pl. XI, fig. 4) :

a. Le réceptacle prolifère notablement pour occuper une grande partie de la surface gélosée, sans qu'il y ait, dans la plupart des cas, constitution d'un cal véritable .

b. La prolifération se localise nettement au niveau des tépales externes. Cette partie latérale reste le plus souvent très chlorophyllienne alors que les tépales se dessèchent très rapidement. Des bourgeons vigoureux et nombreux apparaissent du côté de la face interne du tépale, particulièrement en position latérale, qui est, il faut le souligner, un lieu privilégié de la morphogenèse sur les écailles. Les ébauches produisent rapidement des gaines foliaires tubérisées qui différencient un limbe chlorophyllien .

c. Pour les tépales internes, la prolifération est beaucoup plus faible et les bourgeons sont peu nombreux et peu vigoureux (Pl. XI, fig. 4) .

d. Quant aux étamines, sur 72 bases de filets fixées au réceptacle, trois seulement, ont axillé des bourgeons de faible taille .

e. Au niveau des ovaires, il n'y a eu ni prolifération ni caulogenèse .

La même expérience a été réalisée, sans succès, avec les pièces florales et les réceptacles de Lilium candidum (qui n'a aucune aptitude à former des bulbilles caulinaires). Seuls les pédoncules floraux ont bourgeonné au niveau de la section proximale placée dans le milieu . (Pl. XII, fig. 2) .

En conclusion, les pièces florales comme les feuilles de la tige semblent avoir perdu pour ces 2 espèces de Lilium, la capacité de bourgeonner, même en présence d'une combinaison hormonale favorable. Dans le cas de Lilium (x) "Enchantment", les pièces florales (comme les feuilles de la tige) ont conservé la capacité d'axiller des bourgeons (bulbilles), capacité qui est démasquée après l'action synergique d'hormones ($\text{ANA } 10^{-6} \text{ M} + \text{BA } 10^{-5} \text{ M}$). Si on adopte l'hypothèse que la capacité d'organogenèse naturelle des bourgeons et des racines est contrôlée par des gènes morphogènes spécifiques, (Brachet, 1965) on note donc que le fonctionnement de ces gènes est réprimée au cours de la différenciation des feuilles supérieures et des pièces florales. Toutefois, rien ne permet d'affirmer que le seul facteur permettant l'extériorisation de cette aptitude puisse être un haut niveau de synthèse hormonale, plus particulièrement pour les cytokinines, dont le rôle dans le bourgeonnement est bien établi. On notera cependant qu'il a pu être montré (Chap. VI) une certaine correspondance pour les écailles entre l'aptitude à bourgeonner et le niveau de substances endogènes à action de cytokinine. Enfin, il n'a pas été possible d'obtenir d'embryons à partir des anthères immatures.

III - ETUDE DYNAMIQUE DE L'APPARITION NATURELLE DES BOURGEONS A PARTIR DES FRAGMENTS FOLIAIRES ISOLÉS DE BEGONIA REX PUTZ.

La multiplication des Begonia rex par boutures de feuilles est connue depuis fort longtemps, et utilisée couramment. Plusieurs études histologiques ont été faites sur l'apparition des bourgeons à partir des fragments foliaires. Nous citerons par exemple Regel (1876), Sandt (1920), Simon (1929) et surtout Hartsema (1926) et Prevot (1948). Ce dernier note que "les bourgeons ne proviennent pas de cellules épidermiques quelconques mais uniquement de cellules épidermiques situées au voisinage immédiat de petits poils épidermiques"; on comprend immédiatement l'intérêt d'une telle situation qui permet à l'expérimentateur de prévoir dans quelles

cellules s'établissent les premières réactions menant à l'établissement du bourgeon. A priori, ce matériel végétal peut donc constituer un matériel intéressant pour l'étude du bourgeonnement .

Avant d'entreprendre une étude histologique des modalités d'apparition des bourgeons, dont la connaissance précise est indispensable si on désire intervenir sur la morphogenèse par des traitements pharmacodynamiques exogènes, il a fallu d'une part adopter une variété convenable et d'autre part, préciser des modalités de culture répétables pour les fragments foliaires. Ces recherches sont l'objet des 2 paragraphes suivants :

A - Etude de l'aptitude à la néoformation de racines et de bourgeons pour quelques cultivars de *Begonia rex* Putz. (Bigot, 1967) .

Le travail important de P. Prévot (1939) a montré la dominance du caractère "bourgeonnement épiphyllé" pour divers hybrides de *Begonia* ; mais l'étude systématique du bourgeonnement n'a pas été faite pour les cultivars de *Begonia rex* Putz. La publication déjà ancienne de Chevalier (1939) souligne que "l'espèce" est constituée de nombreuses variétés et hybrides, dont beaucoup n'ont pas de dénomination. Seuls quelques cultivars morphologiquement bien définis seront étudiés ici vis-à-vis de leur aptitude à la néoformation de bourgeons et de racines à partir d'explantats isolés .

Les cultivars comparés, au nombre de quatorze, sont notés dans les tableaux et graphiques par les lettres suivantes :

A - "Raureiff" ; B- "Tricolor" ; C - "Souvenir de Pierre Morel" ; D - "Reiga" ; F - "Louise Closson" ; G - "Météore" ; H - "Marion Louise" ; I - "Merry Christmas" ; K - "Silver Queen" (Jardin d'Auteuil) ; L - "Yser" (Phytotron) ; M - "His Majesty" (Phytotron) ; N - "Mikado" (Phytotron) ; P - "Président Carnot" (Phytotron) ; X - clone issue de "Silver Queen" .

Trois expériences ont été effectuées ; chacune d'entre elles a donné des résultats comparables. Seules les racines issues du fragment foliaire et les bourgeons ayant produit au moins une ébauche foliaire ont été dénombrés. Dans le tableau 5, la vigueur, liée à la rapidité de l'apparition et de la croissance des ébauches est notée au cours du temps, ainsi que le nombre d'explantats ayant des néoformations à un moment donné .

Les figures 1 et 2 de la planche XIII traduisent en fin d'expérience "l'intensité" de la morphogenèse pour les divers cultivars. Ces résultats concernent exclusivement des explantats calibrés de diamètre 20 mm .

Il ressort de ces expériences que la capacité à néoformer dépend qualitativement et quantitativement du cultivar de Begonia rex . Ainsi, les cultivars A, H, K et P forment au bout de quinze jours des néoformations vigoureuses (tableau 5), tandis que les cultivars F, M, N et X ne témoignent d'aucune activité notable au bout de ce laps de temps. Les cultivars C, D, G, I portent lors de la première lecture (2 semaines) des néoformations caulinaires alors que la potentialité de rhizogenèse ne s'est pas exprimée. Le cas inverse ne s'est pas manifesté. Ceci laisse présumer que dans le cas de Begonia rex, il peut y avoir une relative indépendance de la caulogenèse et de la rhizogenèse. Chez les autres cultivars, la formation des racines et des bourgeons est concomittante. Au bout de 35 jours, tous les cultivars ont donné racines et bourgeons .

Du point de vue quantitatif, on note que les cultivars I, F, D ont une potentialité faible de rhizogenèse, par opposition aux cultivars N, A, H et K. La capacité de caulogenèse est particulièrement élevée pour F, H, K, M, N et plus faible pour B, C, I, X. A tous les points de vue, les cultivars A, G, H et K nous ont semblé les plus vigoureux dans ces expériences .

TABLEAU 5 - Intensité du développement des néoformations pour divers cultivars de *Begonia rex* Putz .
 (température constante : 22° C : tube fluorescent "lumière du jour" ; 16 h. de lumière, explantats de 2 cm)
 (ces résultats concernent une expérience) .

Cultivars	Nb. explantats observés	après 15 jours de culture				après 21 jours de culture				après 35 jours de culture				Polarité
		% explants avec bourgeons	vigueur des racines	vigueur des bourgeons	% explants avec bourgeons	vigueur des racines	vigueur des bourgeons	% explants avec bourgeons	vigueur des racines	vigueur des bourgeons	% explants avec bourgeons	vigueur des racines	vigueur des bourgeons	% explants non polarisés
A	28	96	+	+++	100	++	++++	100	++++	++++	100	++++	++++	0
B	23	8	0	0	77	0+	0+	77	0+	0+	100	++	++	0
C	24	50	0	+	83	+	++	83	+	++	100	+++	++++	0
D	22	64	0	++	100	++	+++	100	++	+++	100	++++	+++	0
F	25	0	0	0	56	0+	+	56	0+	+	100	+	+	0
G	26	77	0+	++	100	+	+++	100	+	+++	100	++	++++	4
H	20	95	+++	+++	100	++++	++++	100	++++	++++	100	++++	++++	0
I	27	44	0	+	100	0	++	100	0	++	100	+	++	3
K	24	92	+++	++	100	++++	+++	100	+++	++++	100	++++	++++	13
L	24	11	0	0	100	0+	++	100	0+	++	100	+++	+++	0
M	22	0	0	0	81	0+	0+	81	0+	0+	100	+++	++	0
N	20	1	0	0	85	+	+	85	+	+	100	+++	++	0
P	25	100	+	++	100	++	+++	100	++	+++	100	++++	++++	0
X	23	0	0	0	95	0+	++	95	0+	++	100	+++	++++	0

Notons que les conditions d'éclairement jouent un rôle important dans le dynamisme d'apparition des ébauches. Ainsi la variété I présente en conditions non contrôlées et à faible éclairément, des bourgeons individualisés après plus de 30 jours (P. Prévot, communication personnelle), alors qu'ils se forment en 15 jours en lumière de 16 heures. La technique phytotronique constitue, de ce fait, un des éléments indispensables pour la reproductibilité de ce type d'étude. Toutefois, la lumière n'est pas nécessaire à l'expression du phénomène, comme il l'a été montré d'une part dans des résultats déjà anciens (Prévot, 1939), d'autre part, sur le clone étudié ici (Bigot, 1965) .

La figure 2 montre que l'épiderme inférieur est moins apte à donner des bourgeons (sauf pour le cultivar D) que l'épiderme supérieur. Quant à la polarité, elle apparaît très stricte dans la plupart des cultivars (tableau ⁵4), les néoformations se localisant à la section basale (ou pétio- laire) des explantats. Toutefois, les cultivars H et K ont montré (dans d'autres expériences) des troubles de polarité pour les racines et les bourgeons (jusqu'à 3/5 des explantats pour K) .

En conclusion, les aptitudes diverses mises en évidence ici doivent inciter le chercheur à faire état clairement du cultivar utilisé dans des expériences portant sur Begonia rex Putz. La sécurité de l'expérimentateur sera assurée par l'utilisation d'un clone, facile à créer avec cette espèce ; toutefois, les observations sur le cultivar "Silver Queen" montrent que des plantes issues du bouturage d'une même feuille peuvent présenter des différences morphologiques (forme des feuilles et coloration), ce qui oblige à sélectionner les sujets d'expérience à l'intérieur du clone .

Cette même diversité d'aptitude engage à formuler l'hypothèse qu'il existe chez le Begonia rex Putz, plusieurs facteurs d'enracinement et de bourgeonnement ; leur composition au cours des hybridations

interspécifiques (Prévot, 1939) ou intraspécifiques (Villerts, 1938) détermine des différences notables dans les potentialités de néoformation d'organes à partir de feuilles isolées ou d'explantats foliaires. Rappelons enfin que l'aptitude à la régénération pourrait être un facteur héréditaire dominant (Prévot, 1939).

Pour être un matériel acceptable d'expérimentation, le cultivar choisi doit répondre à plusieurs exigences :

1. Homogénéité dans la réponse en ce qui concerne la polarité de morphogenèse qui sera un de nos sujets de travail. A cet égard, le cultivar K doit être éliminé .

2. Localisation stricte des bourgeons, permettant de repérer avec certitude par l'observation histologique ou par la technique d'autohistoradiographie, les zones de différenciation. Les cultivars qui présentent un bourgeonnement à la face inférieure sont moins favorables (A, D, G, H, K, M, F, N) .

3. "Intensité" de bourgeonnement suffisante, permettant d'utiliser à la fois des substances stimulatrices et inhibitrices de la caulogenèse : les cultivars X, P, C, L peuvent convenir à cet égard. Une activité caulogène trop élevée alourdirait la tâche du dénombrement des néoformations .

4. Nombre de bourgeons sensiblement constant par explantat .

L'intervalle de confiance de la moyenne a été utilisé pour juger les variétés, à la probabilité de 5 %; les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau 6 : le cultivar P et le clone X paraissent bien adaptés à l'expérimentation. Le cultivar P étant déjà utilisé par une autre équipe de recherche, c'est le clone X issu du cultivar "Silver queen" qui constituera le matériel végétal étudié au cours de ce travail .

TABLEAU 6 - Etude de la variabilité du bourgeonnement pour les divers cultivars expérimentés
(probabilité de 5 %)

Variétés	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	P	X
Intervalle de confiance de la moyenne	+1,4 -1,2	+1,2 -1,2	+1,8 -1,8	+2,6 -2,6	+2,6 -2,6	+2,2 -2,2	+3,2 -3,2	+0,4 -0,4	+3,2 -3,2	+1,5 -1,5	+1,8 -1,8	+2,0 -2,0	+0,5 -0,5	+1,2 -1,2
Nombre de bourgeons par explantat	10	7,1	8,3	10,7	18,5	10,6	16,1	16,3	5,6	10,6	16,8	19,6	8,2	8,3

B - Etude des conditions de prélèvement et de culture des explantats .

Le choix du cultivar étant fait , il importe de définir les conditions de prélèvement et de cultures des explantats, de façon à obtenir une méthodologie répétable. Successivement, nous avons envisagé : le lieu de prélèvement sur les feuilles, la surface des explantats, le temps de culture nécessaire à une expression la plus complète possible de la morphogenèse avant la senescence des explantats, l'action de certains facteurs externes (lumière et température), et l'âge des feuilles . D'autre part, on considérera comme bourgeon tout point caulinaire ayant formé au moins une feuille (ayant donc atteint le stade fonctionnel). C'est donc le critère de dénombrement qui sera adopté dans toutes les expériences .

1. Lieu de prélèvement des explantats sur les feuilles mères .

Le but de cette expérience est de déterminer s'il y a sur les feuilles de Begonia rex une zone privilégiée pour le bourgeonnement épiphyllé. Il n'existe en fait aucune étude systématique semblable. Les lieux de prélèvement, répartis sur les diverses nervures ont été prédéterminés comme l'indique la figure 1 de la planche XIV. Les résultats du dénombrement sont rassemblés dans le tableau 7. On peut en conclure que :

a - les fragments (indiqués 7) pris en dehors des nervures principales montrent une activité caulogène réduite, un net retard au développement, mais une activité rhizogène normale. Ceci est un indice que les 2 phénomènes sont en partie indépendants et, en tout cas, tributaires de facteurs différents. Seuls, les explantats prélevés au niveau des nervures principales seront donc employés par la suite .

b - tous les autres fragments bourgeonnent sans que l'on puisse déceler une zone d'activité privilégiée sur la feuille (10,9 bourgeons ⁺ 2,2 à 13,2 bourgeons ⁺ 2,4) .

TABLEAU 7 - Relation entre le bourgeonnement et la position des explantats sur la feuille-mère chez Begonia rex.

Point de Prélèvement	Nombre d'explantats	Nombre de racines / explantat	Nombre de bourgeons / explantat	Intervalle de confiance de la moyenne (bourgeons) à P=0,05	Nombre de bourgeons dominants / explantat
1	22	2,5	11,9	± 1	1,3
2	19	3,3	12,4	± 1,6	1,1
3	19	3,1	11,7	± 0,9	1,1
4	17	2,7	11,4	± 2,0	1,2
5	12	2,4	10,9	± 2,2	1,6
6	15	2,7	12,0	± 2,0	1,6
7	11	3,3	6,7	± 1,5	1,0
8	22	3,4	12,6	± 1,6	1,2
9	14	3,0	12,3	± 1,5	1,0
10	19	3,1	12,1	± 2,0	1,6
11	21	3,5	11,1	± 1,7	1,4
12	9	4,0	13,2	± 2,4	1,7
13	24	2,9	10,7	± 1,5	1,2
14	22	3,4	11,9	± 1,4	1,3
15	21	3,3	11,3	± 1,4	1,2
16	24	2,1	11,6	± 1,5	1,2
17	19	2,8	12,7	± 1,2	1,1
18	20	3,3	12,5	± 1,3	1,4
19	18	3,3	11,9	± 2,0	1,2

c - l'intervalle de confiance de la moyenne dépasse l'unité, ce qui constitue un inconvénient expérimental non négligeable, si on se reporte au nombre de bourgeons formés par explantat .

d - enfin, la polarité est stricte dans tous les cas et le nombre de bourgeons en développement actif (bourgeons dominants) est toujours inférieur à 2. La préséance s'exprime donc rapidement. Il est vraisemblable qu'elle est due au raccordement plus précoce des bourgeons dominants au système vasculaire de l'explantat. Ceci ressort assez nettement de l'étude histologique faite après 5 semaines de culture (voir ce chapitre, paragraphe 3 de C) .

Par la suite, nous avons donc prélevé les fragments foliaires sur les nervures principales, à raison de 12 à 14 explantats par feuille. Toutefois, le trocard provoque des écrasements sur le pourtour des fragments : c'est pourquoi le scalpel lui a été préféré dans la plupart des expériences. Les limbes ont été alors découpés en bande le long des nervures principales, chaque bande étant fractionnée en carrés dont la surface a été déterminée d'après l'expérience suivante .

2. Influence de la surface des explantats sur le bourgeonnement .

Il est indispensable de pouvoir prélever un nombre suffisant d'explantats par feuille, de façon à obtenir une homogénéisation des origines entre les divers traitements à l'intérieur d'une même expérience. Nous avons donc cherché à déterminer la surface optimale d'un fragment en tenant compte de cette condition. L'étude a porté sur des explantats d'un diamètre variant de 2 à 18 mm. Les résultats sont présentés dans la figure 2 planche XIV. Une diminution de la surface entraîne une réduction rapide du bourgeonnement et de l'enracinement. Si l'on veut intervenir sur la stimulation ou sur l'inhibition de la morphogenèse, il est donc indispensable d'expérimenter avec des explantats calibrés

d'une certaine surface : nous avons adopté soit des explantats circulaires d'un diamètre de 18 mm, soit des explantats de forme carrée de 15 mm de côté, découpés au scalpel. Comme on pouvait le prévoir, des fragments de surface décroissante bourgeonnent avec moins de vigueur et en un temps plus long .

3. Durée de la culture .

La durée de la culture a été fixée à 5 semaines, en fonction de plusieurs expériences et observations en milieux divers, avec des explantats de surfaces diverses (rondelles, carrés ou bandes) .

4. Position des explantats pendant la culture .

Les observations rapportées dans la partie IV C 1 montrent que les bourgeons ne se forment pas du côté de la face inférieure des explantats. Nous avons recherché si l'exposition de cette face à la lumière pouvait modifier le sens de ce gradient de morphogenèse. Les résultats rapportés dans le tableau 8 montrent que l'inversion de la position des explantats n'a pas modifié la répartition des bourgeons entre la face supérieure et la face inférieure. Notons que les racines apparaissent indifféremment du côté de la face inférieure ou supérieure, ce qui s'expliquera facilement par l'étude de la structure au niveau nervaire. Ni la polarité ni la dominance n'ont été perturbées par cette inversion .

5. Action des facteurs externes .

a. La morphogenèse s'effectue à l'obscurité complète. Toutefois le délai d'apparition est plus grand et la rhizogenèse presque nulle. La polarité n'a pas été troublée. La surface de l'explantat a joué ici un rôle très important et seuls les explantats de taille supérieure à 3 cm ont bourgeonné, ce qui est en relation vraisemblablement avec le niveau des réserves et des hormones de chaque fragment. Comme on le voit dans le tableau 9, le bourgeonnement semble sans liaison avec une réaction lumineuse qui serait commandée par un pigment tel que le phytochrome .

TABLEAU 8 - Effet de l'inversion des explantats sur le bourgeonnement et la rhizogénèse de fragments foliaires de Begonia rex (Observations après 5 semaines. Explantats carrés de 15 mm de côté).

Po sition de l'explantat	Nombre d'explantats observés	Nombre de racines par explantat	Nombre de bourgeons / explantat au niveau de la face supérieure	Nombre de bourgeons / explantat au niveau de la face inférieure	Total des bourgeons
Face supérieure à la lumière	48	2,8	12,4	0,8	13,2
Face inférieure à la lumière	47	3,1	13,8	0	13,8

TABLEAU 9 - Bourgeonnement d'explantats foliaires de Begonia rex
à l'obscurité (explantats de 3 cm - 5 semaines de cultures)

Nombre d'explantats	Nombre de racines/ explantat	Nombre de bourgeons/ explantat	Nombre d'explantats avec racines	Nombre d'explantats avec bourgeons
50	0,7	10,5	28	47

b. Action de l'éclairement à la température constante (22° C) .

Comme on le voit sur le tableau 10, la lumière n'a que peu d'influence sur la caulogenèse et la rhizogenèse, avec toutefois une stimulation en conditions de jours continus (particulièrement pour la vigueur des racines), fait signalé par Van Onsem (1961) et Kristoffersen (1955), avec des différences variétales. Ni la polarité, ni la dominance, n'ont été troublées par le traitement lumineux. A l'obscurité les explantats de faible taille sont rapidement sénescents, ce qui interdit l'expression des capacités de morphogenèse, morphogenèse qui peut s'effectuer naturellement comme on l'a rapporté dans le tableau 9 avec des fragments foliaires de grande taille .

c. Action de la température pour une durée d'éclairement constante (16 heures) .

Au Phytotron de Gif-sur-Yvette, nous avons comparé l'effet des températures de 17° C et 27° C à celui que l'on observe à 22° C.

- A 17° C, la période nécessaire à la formation des bourgeons devient expérimentalement limitante : il faut en effet un supplément de 2 à 3 semaines pour obtenir des points caulinaires dénombrables sous la loupe ; les explantats sont en général sénescents après ce laps de temps .

- A 27° C, il se produit une accélération de la sénescence des explantats, avant le développement des bourgeons .

A la suite de ces expériences, nous avons adopté pour le maintien en survie des explantats la température de 22° C, une durée de jour de 16 heures, sous une intensité de 2000 à 2600 lux (intensité imposée par les conditions de travail) .

TABLEAU 10 - Action de la lumière (2600 lux) à température constante (22° C) sur la morphogénèse chez Begonia rex (Explantats carrés de 15 mm ; 5 semaines de culture) .

	obscurité complète	9 heures	16 heures	24 heures
Nombre d'explantats	39	43	61	78
Nombre d'explantats avec racines	8	39	57	78
Nombre de racines par explantat	0,2	2,1	2,6	4,0
Nombre d'explantats avec bourgeons	14	43	59	77
Nombre total de bourgeons par explantat	2	11,4	12,2	14,8
Intervalle de confiance de la moyenne (bourgeons)	-	+ - 1,9	+ - 1,1	+ - 1,4
Nombre de bourgeons dominants par explantat	-	1,2	1,0	1,0
Polarité	+	+	+	+
Nombre de bourgeons apparus au niveau de la face inférieure/explantat	0	1,0	0,6	0,7

6. Comparaison des aptitudes à la néoformation en fonction de la photopériode appliquée aux plantes mères (tableau 11) .

Dans cette expérience, l'intensité de morphogenèse s'est montrée inférieure dans les explantats issus des feuilles de plantes placées en jours longs. La vigueur a aussi été plus grande pour les bourgeons nés sur les explantats issus des feuilles de plantes placées en jours courts. La raison réelle de ce phénomène n'est pas connue et pourrait être liée à une accumulation plus grande des hormones ou des réserves dans les plantes de jours courts dont la croissance est moins rapide, la surface foliaire moindre et la ramification faible (développement d'un rhizome court et trapu, mis à profit pour des prélèvements internes de moelle). En tout cas, il est indispensable de prendre en considération les conditions de culture de plantes-mères. La faible surface des feuilles de plantes élevées en jours courts est un facteur limitant dans le prélèvement des explantats. Pour cette raison, ce sont les plantes élevées en jours longs (avec éclairage d'appoint) qui seront utilisées dans toutes les expériences. On notera que Heide (1964) observe avec 2 variétés de Begonia cheimanta Everett que les explantats pris sur les plantes mères élevées en jours courts bourgeonnent mieux, et que les jours longs stimulent la rhizogenèse ; par contre pour cette espèce, l'intensité lumineuse ne semble pas jouer de rôle dans la morphogenèse (Heide, 1965) .

7. Age de la feuille (Bigot, 1966) .

Il est indispensable d'utiliser des feuilles dont la maturité est comparable (2ème ou 3ème feuille bien développée). On a pu noter en effet que les réponses à un traitement par les cytokinines différaient suivant l'âge des feuilles chez la tomate (Mc Hale et Dove, 1969); ou encore que le métabolisme des ARN est différent dans les feuilles d'orge jeunes et âgées (Kulaeva, 1967). Dans la plante entière, les appels moléculaires provoqués par les feuilles jeunes se traduisent par un appauvrissement corrélatif en protéines dans les feuilles adultes,

TABLEAU 11 - Formation de bourgeons et de racines à partir d'explantats foliaires prélevés sur des plantes-mères cultivées en jours courts (obscurcissement par rideau) et en jours longs (éclairage d'appoint par tubes "lumière du jour") .

	Plantes-mères élevées en jours courts	Plantes-mères élevées en jours longs
Nombre d'explantats	88	62
Nombre d'explantats avec racines	88	61
Nombre de racines par explantat	3,4	2,6
Nombre d'explantats avec bourgeons	88	61
Nombre de bourgeons par explantat	11,3	8,4
Intervalle de confiance de la moyenne (bourgeons)	+ - 0,8	+ - 0,8
Nombre de bourgeons dominants	1,1	1,1
Polarité	+	+

appauvrissement qui peut se répercuter sur les capacités morphogénétiques. En ce qui concerne la rhizogenèse, Guillot (1969) sur hypocotyle de tomate, et Mourreau (1940) sur *Coleus* estiment qu'un certain état de maturité des cellules doit être acquis pour que la formation des racines adventives puisse avoir lieu. On s'est donc demandé si les feuilles immatures étaient capables de bourgeonner ; l'expérience a été réalisée avec de très jeunes feuilles de *Begonia rex* Putz, *Peperomia magnoliaefolia* Dietr, ou des écailles immatures de *Lilium Martagnon* L., cult. album et *Lilium* (x) "Enchantment". Le maintien en survie de ces jeunes organes a été possible seulement en présence d'une solution nutritive, dont la composition en mg/l est la suivante : $\text{NO}_3\text{K} : 411$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{OH}_2 : 959$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : 137$, $\text{SO}_4\text{Mg}, 7 \text{ OH}_2 : 548$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 : 137$, $\text{EDTA NaFeOH}_2 : 41$, $\text{H}_3\text{BO}_3 : 3$, $\text{KCl} : 2,7$, $\text{SO}_4\text{Mn}, \text{OH}_2 : 1,7$, $\text{ZnSO}_4, 7 \text{ OH}_2 : 0,27$, $(\text{NO}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{ OH}_2 : 0,27$, $\text{CuSO}_4, 5 \text{ OH}_2 : 0,13$.

Les observations faites sont réunies dans les lignes ci-dessous :

- *Begonia rex* Putz .

L'expérience est menée sur une centaine de jeunes feuilles issues de plantes en voie de développement. Les feuilles ont une dimension de 2 mm à 1 cm. On observe que leur croissance se poursuit après l'isolement. Au bout de 17 jours, les feuilles les plus développées montrent bourgeons et racines. Au bout de 29 jours, toutes les feuilles qui ont survécu à la séparation de la plante mère (environ les 2/3) présentent 1 à 3 racines, 1 à 2 bourgeons localisés au point de concours des nervures. En absence de solution nutritive, la sénescence des jeunes feuilles est rapide et seule la rhizogenèse s'effectue, d'ailleurs avec difficulté. Ce résultat montre que les jeunes feuilles de *Begonia rex* possèdent la faculté de bourgeonner dès les premiers stades de leur développement .

- *Peperomia magnoliaefolia* Dietr .

Des feuilles immatures, de 1 à 5 mm, sont traitées comme celles

de Begonia rex. En fin d'expérience, la longueur de ces feuilles est de 5 à 15 mm. En 10 jours, la plupart des feuilles montrent des ébauches racinaires naissantes au niveau de l'insertion pétioleaire. Au bout de 24 jours, les jeunes feuilles parfaitement saines, possèdent de 3 à 7 racines, très fines ; aucun bourgeon n'est apparu. Dans cette espèce, on a vu que les bourgeons s'individualisent sur les bases racinaires hypertrophiées. En 10 semaines, une seule feuille, la plus vigoureuse, produit une ébauche caulinare sur une excroissance basale. Il est vraisemblable que l'absence de bourgeons est due au faible diamètre des racines néoformées dont la base ne s'est pas hypertrophiée .

- Lilium martagon L. var. album .

Une centaine de jeunes écailles de 2 à 3 mm, issues de bulbilles en voie de croissance ont été mises en végétation. Seize jours après l'isolement, toutes les écailles ont bourgeonné et portent 1 à 2 bourgeons (moyenne 1,5). Au bout d'un mois de culture, des racines adventives apparaissent au niveau de ces bourgeons. Au bout de 10 semaines, une feuille réduite, en spatule, s'est formée ; la gaine tubérisée de cette feuille participe à l'édification du bulbille. Les modalités de développement sont absolument identiques à ce qu'on observe sur les écailles adultes .

- Lilium (x) "Enchantment"

On a voulu tester d'une part les potentialités de morphogenèse sur des écailles jeunes de bulbilles adventifs, qui se développent à l'aisselle des feuilles, d'autre part sur des écailles immatures d'un article de bulbe en voie de formation .

Ecaille des bulbilles adventifs : 68 écailles, montrent, au bout de quinze jours 43 bourgeons dont 1 seul est raciné. Après une culture de 4 semaines, 91 bourgeons, dont 68 sont racinés, sont néoformés sur les écailles .

Ecailles jeunes de l'article du bulbe en formation. Dans les mêmes laps de temps, 57 jeunes écailles ont donné 43 bourgeons non racinés, puis 87 bourgeons dont 24 sont racinés. De plus, on note une prolifération cellulaire localisée aux nervures, formant un cal réduit .

En conclusion, dans les quatre espèces choisies, l'aptitude à bourgeonner ou à s'enraciner n'est pas une propriété qui apparaît au cours de la différenciation, ou qui est liée à un certain état de maturité. Cette aptitude est acquise d'emblée et peut être considérée comme un caractère génétique spécifique, capable de s'exprimer très tôt dans le cas de ces jeunes feuilles immatures. Ce résultat, retrouvé en ce qui concerne le Begonia rex par Arnason, Tran Thanh Van et Prévot (1967), infirme les premières observations de Prévot (1939) .

8. En conclusion, les résultats exposés précédemment et le choix délibéré d'eau distillée stérile pour le maintien en survie des explantats ont permis de normaliser les conditions de développement des explantats, telles qu'elles ont été décrites dans le chapitre III "Méthodes et techniques" .

C - Etude histologique de la dynamique de l'apparition des néoformations pour le clone choisi (Bigot et Chlyah, 1968) .

Seule, la connaissance exacte des modalités de la néoformation dans le temps, en conditions contrôlées, permet une interprétation sûre (si elle est possible) des résultats obtenus dans une étude métabolique ou pharmacodynamique. Cette condition nous est apparue tout à fait indispensable à la poursuite de notre travail. Une étude histologique systématique dans le temps a donc été entreprise sur l'apparition des néoformations au niveau de la section proximale ainsi qu'une étude partielle au niveau de la section distale. La coloration adoptée est celle d'Unna qui, accompagnée du test de contrôle à la ribonucléase, permet de

juger de la reprise d'activité de synthèse pour les ARN. Cette étude, illustrée par les planches XV à XIX et le tableau 12 a donné lieu aux observations suivantes :

1. Au moment de la séparation de la plante mère, il n'y a pas de méristème préétabli à la face supérieure de la feuille, ni dans la région du limbe, ni dans la région de la nervure, lieu habituel de la formation des bourgeons. La structure anatomique à ce niveau (Pl. XV) peut être résumée ainsi :

- l'épiderme supérieur, recouvert d'une cuticule très fine, est constitué de cellules banales totalement différenciées et de poils glanduleux de petite taille, dont la cellule basale présente des caractères de jeunesse incontestable : nucléole gonflé ($1,2\ \mu$ de diamètre alors qu'il est à peine visible dans les cellules épidermiques) et noyau ($5,9\ \mu$ de diamètre contre $5,3\ \mu$ pour les cellules épidermiques) très colorable par la pyronine (activité importante de synthèse des ARN), vacuome morcelé, cytoplasme montrant aussi une forte affinité pour la pyronine. A priori, on peut penser que ces cellules joueront un rôle dans la constitution des méristèmes. Elles sont différentes en tout cas des autres cellules épidermiques .

- Sous l'épiderme supérieur, dans l'axe nerveaire, on trouve un collenchyme rond de 4 à 5 épaisseurs cellulaires, remplacé au niveau du limbe par une seule assise de parenchyme palissadique chlorophyllien ; celui-ci se poursuit sous le collenchyme au niveau de la nervure .

- Les formations vasculaires sont constituées par un pachyte circulaire discontinu, dont le xylème comporte peu de vaisseaux. Le phloème est situé vers l'extérieur ; les racines néoformées prennent naissance au niveau des ~~formations~~ libériennes, dont la répartition régulière explique l'apparition indifférente de ces organes du côté inférieur ou supérieur du fragment foliaire .

TABEAU 12 - Tableau récapitulatif des observations cytologiques pour le Begonia rex.

(on appelle zone privilégiée d'initiation, notée Z. P. I., l'ensemble formé par le poil glanduleux et les cellules épidermiques qui lui sont contiguës. Les coupes sont réalisées longitudinalement à l'épaisseur de 6 μ ou 8 μ dans la région de la section proximale des explantats, lieu habituel de la morphogénèse).

Nombre de jours après la séparation	Nombre de coupes observées	Nombre de Z. P. I. (face supérieure)	% de Z. P. I. en mitose	Nombre de Z. P. I. (face inférieure)	% de Z. P. I. en mitose
0 jour	456	391	0	275	0
1 jour	445	225	0	-	-
3 jours	317	132	5,3	310	0
5 jours	458	233	13,3	505	0
7 jours	486	458	13,1	-	-
11 jours	366	150	17,3	-	-
13 jours	516	240	20	-	-

- Ces formations sont incluses dans un parenchyme peu lacuneux, riche en amidon, formé de 5 à 6 assises cellulaires au niveau du limbe, comportant des cristaux d'oxalate de calcium en oursin et des sclérites de faible longueur, très résistants, provoquant par entraînement des déchirures importantes dans les coupes .
- Enfin, l'épiderme inférieur, constitué comme l'épiderme supérieur, comporte de nombreux stomates. Il est surmonté, au niveau de la nervure, de quelques assises de collenchyme .

2. Un jour après le prélèvement, aucune réactivité nucléolaire ou nucléaire, n'est décelable, sauf dans le parenchyme adjacent à la blessure, lieu de constitution de la zone cicatricielle (Pl. XVI, fig. 5, 6 et 7). Il est intéressant de noter la rapidité d'apparition de cette réactivité au niveau de la zone blessée, dans la mesure où elle pourrait jouer un rôle initiateur dans la reprise de mitose des Z.P.I. . Les premières divisions constitutives de la zone cicatricielle apparaissent à la fin du 2ème jour .

3. Trois jours après l'isolement (Pl. XVIII, fig. 1, 2, 3 et 4), les cellules adjacentes à la base du poil glanduleux retrouvent une affinité nucléaire et nucléolaire pour la pyronine, puis commencent leur division (Pl. XVII, fig. 5 et 6). Par contre, la cellule basale du poil glanduleux ne montre aucune réaction, ni aucune division. Au cours de nos multiples observations nous n'avons relevé aucun exemple d'une néoformation de bourgeons en dehors de cette zone (Pl. XVI, fig. 1, 2, 3 et 4). Nous appellerons dans le texte zone privilégiée d'initiation (Z.P.I.) le complexe constitué par le poil glanduleux et les cellules épidermiques (4 à 5) qui leur sont contiguës. La cellule basale de celui-ci semble jouer un rôle important dans l'impulsion mitotique et surtout dans la position des premières cellules filles issues des cellules épidermiques adjacentes au poil glanduleux, cellules qui acquièrent des caractères méristématiques nets dès le 5ème jour suivant la séparation

(Pl. XVIII, fig. 1, 2, 3 et 4). La première mitose est péricline, elle est suivie pour la cellule fille supérieure d'une division anticline inégale qui donne naissance à une cellule de petite taille très méristématique, située contre la cellule basale du poil glanduleux, et à une cellule encore différenciée ; celle-ci se divise par la suite d'une manière anticline, amorçant la formation d'une assise cellulaire externe, qui constituera la tunica du futur méristème (Pl. XIX). Par contre, la cellule inférieure née de la première division péricline se divisera sans ordre et donnera naissance à un massif. Cependant, on constate que les cellules les plus méristématiques sont toujours situées près de la cellule basale du poil. Il arrive que l'une des cellules adjacentes se divisent plus rapidement et se trouve alors plus particulièrement à l'origine du méristème. Autour de la zone de division, de nouvelles cellules épidermiques peuvent être réactivées tardivement, toujours en liaison avec la mise en place d'un méristème. En conclusion, l'initiation mitotique "rayonne" à partir de la base du poil (qui reste inerte dans la quasi totalité des cas (pl. XIX, fig. 1) : cette observation nous permet d'envisager l'hypothèse d'une "information" circulant de cellule à cellule, déterminant de nouvelles potentialités de synthèse d'ARN (reprise d'affinité à la pyronine) et conduisant les cellules différenciées au point de division. Aucune cellule épidermique en dehors de zones précédemment décrites n'est réactivée. Le méristème néoformé se constitue donc exclusivement à partir des 4 ou 5 cellules différenciées qui entourent le poil glanduleux.

Enfin, on doit ajouter qu'au delà des 2 premiers milli mètres adjacents à la section proximale, les zones privilégiées d'initiation restent inertes. Il est donc possible que la blessure joue un rôle d'inducteur qu'il ne faut pas négliger, hypothèse qui sera examinée plus loin à propos de la polarité .

4. Treize jours après l'isolement, on note que 20 % seulement des Z. P. I. sont entrées en division dans la zone proximale. Il y a donc une limitation à la reprise d'activité. Nous verrons qu'un traitement

exogène par les cytokinines appliqué pendant les premières 24 heures suivant l'isolement, entraîne une stimulation mitotique pour la totalité des Z.P.I. (Chap. VII) : il est vraisemblable que les premiers points caulinaires formés créent des courants moléculaires privilégiés dirigés vers eux et inhibent ainsi les Z.P.I. qui ne sont pas réactivées. Au cours des 13 premiers jours, on ne peut pas déceler de liaison entre la rhizogenèse et la caulogenèse. Les racines apparaissent plus tardivement dans la zone périlibérienne des faisceaux vasculaires et il semble que les deux phénomènes soient indépendants l'un de l'autre. Par contre, les liaisons vasculaires entre le méristème caulinaire et le système conducteur de l'explantat s'amorcent après ce laps de temps, à partir du futur bourgeon. Ceci met de nouveau en évidence l'action d'une zone méristématique sur la différenciation des ensembles conducteurs. Enfin il est intéressant de remarquer que l'épiderme inférieur reste totalement inerte, bien qu'il présente aussi des poils glanduleux. Par conséquent, l'expression du caractère génétique conduisant à la constitution d'un bourgeon néoformé ne se démasque d'une manière naturelle que dans quelques cellules bien définies, dont la position n'est pas indifférente. On verra que leur sensibilité à l'action des cytokinines (Chap. VII) révèle un état de réceptivité particulier. Dans la planche XX, nous avons réunis quelques documents au trait résumant cette période de développement.

5. A la fin de la période de culture (5 semaines), l'étude histologique donne les renseignements suivants :

- a - Dans les coupes correspondant à la zone de cicatrisation, l'amidon est absent ; par contre de nombreuses cellules sont lignifiées (Pl. XXII, fig. 1).
- b - Dans la zone de bourgeonnement, les mamelons non fonctionnels sont nombreux : ils présentent seulement un début de différenciation des systèmes conducteurs, sans que la liaison ne soit établie avec l'appareil vasculaire du fragment foliaire (Pl. XXI, fig. 2, 3 et 4), contrairement aux bourgeons dominants (Pl. XXI, fig. 1). Il est vraisemblable que cette

absence de différenciation soit une cause prédominante du "blocage" de nombreux points caulinaires, comme l'indique Sachs (1970) à propos des bourgeons **axillaires**. Sorokin et Thimann (1964), et Husain (1965) indiquent aussi une liaison très nette entre dominance et vascularisation (pois) .

c - Dans les tissus qui entourent les bourgeons fonctionnels (Pl. XXII, fig. 3), il y a **accumulation** nette d'amidon par rapport aux régions entourant par exemple les zones vasculaires. Ce fait est souligné déjà par Thorpe (1969, 1970) dans les cals de tabac formant des bourgeons. En **tous** cas, il est vraisemblable que l'absence de réactivation d'un grand **nombre** de zones privilégiées d'initiation ne peut être expliquée par une limitation des réserves énergétiques potentielles .

d - En dehors de la zone de bourgeonnement, les grains d'amidon sont présents, en particulier autour des ensembles conducteurs (Pl. XXII, fig. 2) .

e - La naissance des racines endogènes s'effectue sans liaison avec les bourgeons (Pl. XXII , fig. 4) .

Parmi ces observations effectuées à la fin de la période de culture, le point le plus important semble être l'absence de différenciation des cordons vasculaires pour les points caulinaires initiés, mais non **fonc-**tionnels ou pour les bourgeons dominés. Il est possible que les bourgeons dominants **drainent** vers eux métabolites et hormones, dont le taux devient insuffisant localement pour **ass**urer le développement des autres bourgeons ; on connaît en effet l'action des auxines sur la différenciation du xylème à partir de cellules parenchymateuses (Camus, 1949 ; Jacobs, 1952 ; Wet**more** et Rier, 1963 ; Sachs, 1968) ou à partir du cambium (Lamotte et Jacobs, 1963 ; Thompson et Jacobs, 1968). On verra dans le chapitre VII les effets d'un apport exogène en hormones sur la morphogenèse .

6. En conclusion, l'établissement des ébauches de bourgeons est strictement lié à l'insertion des poils glanduleux. Le

cultivar qui sera utilisé dans la suite des expériences est donc particulièrement intéressant par la localisation précise et constante des cellules initiant les bourgeons . Ce caractère permettra de réaliser avec plus de sûreté une étude plus fine des réactions métaboliques précédant la première mitose ou accompagnant la mise en place de ces organes . A partir d'un autre cultivar, Tran Thanh Van (1970) trouve que l'aptitude à la néoformation de la plupart des cellules épidermiques peut-être mise en évidence; toutefois, cet auteur indique qu'il convient de se demander pourquoi, parmi toutes les cellules contiguës (au poil glanduleux) activées, le méristème s'organise en un endroit et non pas en un autre "; ceci laisse penser qu'il y a bien là aussi un lieu privilégié de la néoformation comme nous le notons dans notre cas, au niveau de certaines cellules. Par contre, dans la zone de blessure, toutes les cellules épidermiques peuvent être stimulées à la mitose ; il s'agit là de l'effet immédiat du traumatisme conduisant à la mise en place de l'assise cicatricielle. Enfin pour notre cultivar, nous n'avons jamais observé (à 1 ou 2 exceptions près sur des milliers d'explantats mis en culture) la formation de leptotriches, poils néoformés d'origine épidermique, comme ceci a pu être décrit en détail par Arnaud (1970) ; pour les bourgeons néoformés, cet auteur donne des images tout à fait analogues aux nôtres .

I V - CONCLUSIONS GENERALES .

Il était nécessaire, avant d'aborder l'étude expérimentale des facteurs du bourgeonnement sur des explantats foliaires isolés, de connaître sans ambiguïté les modalités de la néoformation pour certaines espèces. C'est la raison pour laquelle cette longue étude histologique a été entreprise. Les conclusions en sont les suivantes :

1 - Chez le Peperomia, les bourgeons se localisent sur la base de la racine néoformée. La caulogenèse est donc dépendante de la rhizogenèse. Tout facteur physique ou chimique agira d'abord sur l'enracinement, rendant

difficile l'étude du bourgeonnement. Ce matériel végétal est donc peu propice à l'étude de ce phénomène .

2 - Dans le cas du Lilium, l'apparition péalable d'un bourrelet méristématique indifférencié, suivie de la néoformation des points caulinaires apparente cette modalité de morphogenèse à ce qu'on observe en culture de tissus. De plus, le faible nombre de points caulinaires (2 à 3) ne permet pas d'utiliser avec efficacité les inhibiteurs de la morphogenèse. On remarquera que la capacité de former des bourgeons disparaît lorsque la tubérisation des organes foliaires n'a plus lieu .

3 - Parmi les espèces qui produisent des bourgeons épiphylls, le clone de Begonia rex étudié présente une particularité précieuse pour l'expérimentateur : les poils glanduleux épidermiques constituent un "marqueur" histologique exceptionnel pour une étude moléculaire précise dans les trois ou cinq premiers jours de l'initiation du développement des points caulinaires : en effet, cette initiation s'effectue strictement à partir des quelques cellules épidermiques différenciées qui entourent la cellule basale du poil (zone privilégiée d'initiation). Pour cette raison, ce matériel retiendra toute l'attention dans les chapitres qui suivent. Quelques expériences concernant les autres espèces seront néanmoins rapportées à titre indicatif .

4 - L'initiation des bourgeons au niveau de l'épiderme ou de l'assise sous-épidermique chez Lilium et Begonia, ou dans la zone corticale racinaire chez le Peperomia suggère que les facteurs contrôlant cette néoformation se localisent strictement au cours du développement. La même observation peut être faite à propos des racines qui apparaissent exclusivement dans une zone profonde périlibérienne .

CHAPITRE V

EPIDERME ET CAULOGENESE

Les observations cytologiques rapportées à propos de l'espèce Begonia rex dans le chapitre IV laissent penser que l'épiderme pourrait être dépositaire de l'aptitude à bourgeonner. Ce problème pouvait être abordé soit d'une manière expérimentale, par exemple par la culture in vitro d'épiderme séparé ou par l'induction de proliférations tissulaires avec ou sans lignées de cellules d'origine épidermique, soit en recherchant certaines caractéristiques cytologiques et métaboliques des cellules responsables de l'établissement du bourgeonnement. Ce sont les résultats obtenus par ces deux voies de recherches qui sont exposés ci-dessous .

I - L'EPIDERME, DEPOSITAIRE DE L'APTITUDE A BOURGEONNER
CHEZ BEGONIA REX : PREUVES EXPERIMENTALES IN VITRO .

Le pétiole possède, comme les fragments foliaires, la capacité de former des bourgeons à partir de l'épiderme ; cet organe, dont la désinfection et la culture sur milieu gélosé est plus facile, a été choisi de préférence pour mettre en place les expériences suivantes :

1. Culture de l'épiderme séparé.
2. Cultures d'explantats dont l'épiderme est supprimé.
3. Induction de proliférations tissulaires avec ou sans lignée de cellules d'origine épidermique .

Il a été tenté, en outre, de cultiver des fragments de moelle de rhizome de Begonia rex, pour lesquels l'absence de cellules épidermiques ne peut être contestée .

A - Tentative de culture d'épiderme séparé .

Les fragments épidermiques (2 cm x 0,5 cm), prélevés sur les nervures principales ou sur les pétioles, ont été cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog en présence ou en l'absence d'une cytokinine (benzylaminopurine à la concentration de 10^{-6} M et 10^{-5} M/ litre de milieu ; 46 répétitions), ou d'une auxine (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à la concentration de 1 mg/litre de milieu, soit environ 5×10^{-6} M). Il a été tenté aussi de prélever des fragments épidermiques 6 jours après l'isolement des explantats, dans le but de savoir si les mitoses amorcées précocement dans les cellules qui sont à l'origine des bourgeons étaient susceptibles de s'autoentretenir après la séparation du tissu. Il faut noter qu'une ou deux assises de tissu sous-jacent (collenchyme) sont entraînées avec l'épiderme. Cette tentative de culture de fragments épidermiques séparés a malheureusement échoué. Les contrôles microscopiques ont montré un seul cas de division, au niveau de cellules contiguës à la base des poils glanduleux, et les fragments n'ont pu être maintenus en survie. L'action du désinfectant n'est vraisemblablement pas en cause, car le bourgeonnement s'effectue normalement à partir de l'épiderme en place. La participation des autres tissus de l'explantat semble donc indispensable à la formation des bourgeons, les cellules épidermiques privilégiées constituant un récepteur des facteurs nécessaires à leur mise en place. Toutefois, cette expérience sera à compléter en utilisant une gamme plus variée de milieux ou de combinaisons hormonales. L'obtention de bourgeons à partir de l'épiderme séparé serait dans le cas de Begonia rex particulièrement intéressante : en effet, la spécificité des cellules qui sont à l'origine des points de bourgeonnement pourraient donner des indications importantes sur les facteurs nutritionnels ou hormonaux qui permettent l'expression de

TABLEAU 13 - Effet de la suppression de l'épiderme sur l'aptitude à la néoformation d'organes à partir de fragments pétiolaires de Begonia rex (milieu de Murashige et Skoog; 2 mois 1/2 de culture)

	Avec épiderme				Sans épiderme			
	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre d'explantats avec racines	Nombre d'explantats avec les 2 néoformations	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre d'explantats avec racines	Nombre d'explantats avec les 2 néoformations
Témoin	35	35	12	12	43	0	0	0
ANA 10 ⁻⁵ M	11	11	11	11	15	0	15	0
BA 10 ⁻⁵ M	13	13	0	0	19	0	0	0

de l'aptitude au bourgeonnement (mise en activité de gènes morphogènes ?).

B - Effet de la suppression de l'épiderme sur l'aptitude à bourgeonner.

1. Fragments de pétiole (Pl. XXIV, fig. 4 et 5) .

Les fragments de pétiole intacts ou débarassés de leur épiderme sont cultivés en présence ou non d'hormones (ANA 10^{-5} M et BA 10^{-5} M). La section proximale ou caulinaire des explantats est en dehors du milieu. Les observations faites après plus de 2 mois de culture sont réunies dans le tableau 13 .

L'épiderme apparaît comme indispensable à l'établissement du bourgeonnement dans cette espèce et la benzylaminopurine, substance qui stimule vigoureusement la caulogénèse à partir des explantats intacts, est sans effet sur les explantats sans épiderme. L'acide naphthalène-acétique a provoqué l'apparition de nombreuses racines à partir de ces derniers, sans inhiber la formation naturelle des bourgeons sur les explantats intacts : cette substance n'altère pas la polarité de morphogénèse, contrairement à la benzylaminopurine .

2. Explantats foliaires .

Si l'on supprime l'épiderme au niveau des nervures principales, la partie dénudée est incapable de former des points caulinaires. Des bourgeons peuvent apparaître sur les flancs de la nervure, partie où l'épiderme subsiste.

C - Obtention d'une culture de tissu .

L'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) a la propriété de stimuler vigoureusement l'activité mitotique et permet d'obtenir des cals à partir de fragments isolés. Une expérience préliminaire a montré que de telles proliférations se développaient en présence de cette substance incorporée à la concentration de 3 mg/l dans le milieu ; la concentration

de 1 mg/l n'est pas stimulatrice, celle de 6 mg/l est toxique. Le cal se développe du côté de la section proximale ou caulinaires de l'explantat ; à cette concentration, la rhizogenèse est stimulée, mais la caulogénèse n'est pas supprimée. Il a été alors tenté d'obtenir 2 types de souches tissulaires, dont l'une ne comporterait pas de cellules d'origine épidermique par suppression préalable de l'épiderme ; la même tentative a été faite avec des fragments de moelle de rhizome de Begonia .

1. Cals issus de fragments pétioles avec épiderme
(Pl. XXIII, fig. 1 et 2) .

Les cals, de fort volume et généralement assez fermes après 8 semaines de culture, présentent d'abondantes racines tuméfiées et courtes. De nombreux bourgeons se forment sur la prolifération tissulaire issue du fragment. Sur 33 explantats, 22 présentent des bourgeons, 2 seulement ne forment aucune racine. Les cals ont été séparés de l'explantat et cultivés en présence d'une concentration plus faible (1 mg/l) de 2 4-D, après élimination des parties mortes et des racines tuméfiées. Ils ont continué leur croissance et la morphogénèse s'est manifestée abondamment. Plusieurs repiquages ont été effectués dans les mêmes conditions avec les mêmes réactions. On a remarqué en particulier que les points caulinaires étaient souvent à l'origine de la formation de nouvelles proliférations. Dans certains cas, des lames foliacées non pétiolées se développent (Pl. XXIV, fig. 2 et 3) et donnent naissance au niveau des poils glanduleux à de nouveaux bourgeons, présentant souvent des feuilles anormales peltées, dont la morphologie est analogue à celle des feuilles obtenues après l'action de la morphactine (dérivé chloré du fluorénol)(Pl. XXIV, fig. 1). Les cals ne peuvent être maintenus en culture sans apport de 2,4-D (une combinaison hormonale $BA\ 10^{-6}\ M + ANA\ 10^{-7}\ M$ n'est pas efficace). Dans les conditions de l'expérience, les capacités de bourgeonnement ont été conservées pendant plus de 2 ans .

2. Cals issus de fragments pétiolaires sans épiderme
(Pl. XXIV fig. 1)

37 fragments ont été mis en culture ; trois seulement ont présenté localement 1 ou 2 bourgeons ; dans ce dernier cas, il est possible qu'un lambeau d'épiderme soit demeuré en place sur l'explantat. Les cals obtenus en présence de 2,4-D blanchâtres et de consistance molle, ont un aspect différent de ceux obtenus à partir d'explantats possédant leur épiderme; Ils ont pu être maintenus en survie pendant un temps limité sur le même milieu sans qu'aucun bourgeonnement ne se manifeste. Il apparaît donc qu'une prolifération tissulaire ne comportant pas de cellules d'origine épidermique perd l'aptitude à bourgeonner .

3. Prélèvement dans la zone médullaire de rhizome de *Begonia rex* .

Des plantes élevées sous un éclairage de huit heures par jour présentent un rhizome court et trapu, à l'intérieur duquel des prélèvements internes peuvent être pratiqués. Les explantats (diamètre et longueur de 5 mm) sont ensemencés horizontalement ou verticalement en présence soit de 2,4-D (3 mg/litre de milieu) soit d'une combinaison hormonale constituée par de la benzylaminopurine (10^{-5} M) et de l'acide naphthalène-acétique (5×10^{-6} M). Aucun des 72 explantats n'a formé de cal avec le 2,4-D. Il n'y a pas eu non plus d'initiation de bourgeons. La combinaison hormonale a permis d'obtenir la différenciation de cals réduits à partir de 2 explantats (sur 24) dont l'un a donné un bourgeon. On peut donc dire que la partie médullaire est incapable de proliférer ou de bourgeonner dans les conditions où les explantats pétiolaires pourvus de leur épiderme ont une réaction vigoureuse .

D- Conclusion .

Ces quelques expériences montrent que l'aptitude à bourgeonner disparaît, même en présence de substances stimulantes, lorsque

l'épiderme est supprimé sur des explantats foliaires ou pétiolaires de Begonia rex (clone). Dans les mêmes conditions, des cals obtenus après stimulation par le 2,4-D et comportant des cellules d'origine épidermique se maintiennent en survie, et bourgeonnent abondamment (en présence d'une dose faible de 2,4-D). Si aucune lignée cellulaire d'origine épidermique ne participe à l'édification du cal, ce dernier dépérit et ne produit aucun point caulinaire. Il y a donc là une preuve expérimentale que l'épiderme détient exclusivement l'aptitude à former des bourgeons. Les observations cytologiques rapportées précédemment ont montré de plus que cette aptitude s'exprime au niveau de cellules bien définies. Par conséquent, si on admet l'hypothèse que l'aptitude à bourgeonner est sous le contrôle de certains gènes "morphogènes" (Brachet, 1965), l'expression de ceux-ci, chez le Begonia rex, ne semble possible qu'au niveau d'un nombre réduit de cellules épidermiques foliaires différenciées. De ce fait, cette espèce constitue un matériel de choix pour l'étude des facteurs qui stimuleraient l'organogenèse de bourgeons à partir de cellules quiescentes non méristématiques.

II - ETUDE CYTOLOGIQUE ET METABOLIQUE DES ZONES PRIVILEGIEES D'INITIATION DE BOURGEONS AU COURS DES PREMIERES 48 HEURES APRES LA SEPARATION DES EXPLANTATS .

C'est au cours des trois premiers jours suivant la séparation de la plante-mère que se décident l'évolution des zones privilégiées d'initiation, comme l'indiquent les observations histologiques précédemment exposées. Ce laps de temps a donc une importance primordiale dans l'établissement d'un métabolisme particulier lié au bourgeonnement et c'est au cours de cette période que l'on pourra agir sur l'information conduisant à la reprise des mitoses et à l'organisation des points caulinaires, fait qui sera exploité dans l'étude pharmacodynamique constituant la dernière partie de ce travail. Le groupement caractéristique des premières

cellules méristématiques autour de la cellule basale du poil glanduleux incite à tenter d'éclaircir le rôle de ce dernier dans l'initiation des points caulinaires. On peut formuler l'hypothèse que la cellule basale émet un message, reçu et interprété par les cellules qui lui sont contiguës et, dans ces conditions, on peut rechercher pour ces dernières des caractéristiques cytologiques susceptibles de les différencier des autres cellules épidermiques. C'est dans cet esprit qu'il a été entrepris, au cours des premières 48 heures après la séparation :

- A - Une étude cytologique précise des zones d'initiation et de la zone de blessure,
- B - Une étude des caractéristiques de l'incorporation de la thymidine tritiée dans la zone de bourgeonnement,
- C - une étude de l'incorporation d'uridine tritiée .
- D - une étude de l'incorporation de la lysine tritiée .

La méthode d'autohistoradiographie a donc été utilisée pour les 3 dernières études. Malheureusement, comme le fait remarquer Duprez (1967) si c'est "la seule méthode qui associe les renseignements structuraux et métaboliques d'une manière dynamique, elle se prête mal aux analyses quantitatives absolues". Dans notre cas, aucune mesure biochimique quantitative n'est susceptible de rendre compte des phénomènes étudiés, étant donné la diversité des tissus qui sont mis en cause et l'impossibilité de dégager la part de l'un ou de l'autre de ces tissus .

A - Etude cytologique des zones privilégiées d'initiation .

1. Position des noyaux des cellules épidermiques adjacentes à la cellule basale du poil glanduleux (Bigot, 1970) .

Dans l'hypothèse où la cellule basale détiendrait génétiquement les informations nécessaires à l'initiation et à la constitu-

tion des points de bourgeonnement, il semblait intéressant de rechercher si les noyaux des cellules épidermiques adjacentes n'occupaient pas une position privilégiée par rapport à cette cellule .

Les résultats (tableau 14) indiquent que 84,6 % des noyaux des cellules épidermiques initiant les bourgeons sont situés au contact de la paroi de la cellule basale du poil épidermique au moment du prélèvement des explantats (Pl. XXV). Si cette dernière cellule joue un rôle d'induction dans la reprise de l'activité mitotique ou dans le bourgeonnement, ces noyaux sont donc dans une position privilégiée pour recevoir un éventuel message .

2. Caractéristiques du noyau des cellules épidermiques adjacentes .

L'étude précédemment rapportée a montré aussi que les noyaux des cellules qui sont à l'origine des bourgeons possèdent des caractéristiques habituelles de noyaux de cellules quiescentes : nucléole de petite taille, peu colorable et non vacuolisé, chromocentres très nombreux et bien visibles, faible diamètre du noyau ; ces caractères les différencient de la cellule basale du poil glanduleux, qui paraît métaboliquement active. Dans certains cas, sur le flanc de la nervure au point de jonction avec le limbe, on peut observer au contact d'un poil glanduleux une cellule épidermique moins différenciée (pour laquelle le vacuome est dispersé). Toutefois, les zones privilégiées d'initiation qui possèdent cette caractéristique ne sont pas plus particulièrement à l'origine des bourgeons néoformés .

3. Recherches des histones dans les cellules épidermiques (Bigot, 1970) .

Certains travaux montrent une relation significative entre l'abondance des histones dans le noyau et le ralentissement du métabolisme cellulaire : en effet, certaines de ces protéines basiques spécifi-

TABEAU 14 - Position des noyaux des cellules épidermiques initiant les bourgeons par rapport à la cellule basale des poils glanduleux .

Moment de l'observation	Nombre de noyaux observés	Pourcentage de noyaux au contact de la cellule basale
Lors du prélèvement des explantats	300	84,6 %
après 12 heures	103	82,5 %
après 24 heures	175	76 %

TABEAU 15 - Affinité pour le vert solide FCF des constituants nucléaires des cellules épidermiques banales, des cellules épidermiques adjacentes aux poils glanduleux et de la cellule basale des poils glanduleux (côté pétiolaire ou proximale des explantats) .

Nature des cellules observées	Moment de l'observation						
	Lors du prélèvement			24 heures après le prélèvement			
	cellules épi-dermiques banales	cellules épi-dermiques adjacentes	cellules basales des poils glanduleux	cellules épi-dermiques banales	cellules épi-dermiques adjacentes	cellules basales des poils glanduleux	
Nombre de noyaux observés	340	233	95	776	98	56	
Nb et % de noyaux à nucléole et chromocentres également et nettement colorés	132 38,8 %	94 40,3 %	39 41 %	134 18,6 %	38 38,8 %	30 53,5 %	
Nb et % de noyaux à nucléole et chromocentres également et faiblement colorés	181 52,8 %	136 58,6 %	56 59 %	90 11,6 %	18 18,3 %	15 26,8 %	
Nb et % de noyaux à nucléole très coloré et chromocentres faiblement colorés ou disparus	6 1,7 %	1 0,4 %	0 0	515 66,1 %	19 19,4 %	2 3,5 %	
Nb et % de noyaux à nucléole peu coloré et chromocentres très colorés	23 6,7 %	2 0,8 %	0 0	37 3,7 %	23 23,5 %	9 16,2 %	

quement nucléaires pourraient bloquer éventuellement les sites de synthèse des ARN messagers (rôle de répresseurs) et seraient impliqués dans la formation des chromocentres (In Bonner et Tsu's, 1964 ; Bloch, 1966 ; Jalouzot, 1969 ; Sauter et Marquardt, 1967 ; Sauter, 1969). Cependant, il faut remarquer que l'on distingue 2 fractions principales d'histones l'une, plus riche en lysine, sans renouvellement pendant l'intercynèse jouerait un rôle prépondérant dans la stabilisation de la chaîne de l'ADN ; la seconde, plus riche en arginine, montrant un certain renouvellement au cours de l'intercynèse, à acétylation variable, pourrait bloquer les gènes (Allfrey et collab., 1964). In vitro l'addition d'histones bloque la synthèse des ARN, alors que l'hydrolyse ménagée des nucléoprotéines provoque une stimulation de la production des ARN (In Bonner et Tsu's, 1964, 267-288). En conclusion, il semblerait donc que les cellules riches en histones, comme la cellule reproductrice des grains de pollen par exemple, seraient maintenues en "dormance métabolique" et révéleraient leur potentialité de synthèse seulement dans certaines conditions (au moment de la formation des anthérozoïdes dans le cas cité). Il a donc été recherché si les cellules épidermiques des zones privilégiées d'initiation possédaient des caractéristiques particulières pour les histones, vis-à-vis des cellules épidermiques banales. La coloration au vert solide FCF (Fast green) à pH 8,1 a été utilisée pour mettre en évidence ces substances dans notre matériel, avec les contrôles de spécificité exposés dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Malgré un protocole strict, la méthode de coloration par le vert solide en milieu alcalin montre une certaine variabilité des colorations absolues. Ce sont les colorations relatives du nucléole, du nucléoplasme, et des chromocentres (hétérochromatine considérée comme génétiquement inactive) qui ont été appréciés pour les divers types de cellules épidermiques et qui figurent dans le tableau 15 .

Au moment du prélèvement jusqu'à 12 heures après le prélèvement
(Pl. XXXVI, fig. 1 et 2) les cellules épidermiques banales et les cellules

épidermiques initiant les bourgeons épiphyllés sont identiques vis-à-vis de leur réaction à la coloration par le vert solide FCF ; on note que la coloration du nucléoplasme est moins intense sur le flanc de la nervure que dans l'axe de celle-ci, pour les cellules épidermiques banales ; toutefois, les cellules situées au niveau de l'axe nerveux, ainsi que leur noyau, sont de taille moindre ; la différence de coloration peut-être due à un effet de dilution. Les protoplastes épidermiques et les chloroplastes parenchymateux sont colorables par le vert solide. Après 24 heures (Pl. XXVI, fig. 3 et 4) des modifications structurales sensibles s'amorcent au niveau des cellules épidermiques banales (du côté pétiolaire) dans la zone immédiatement adjacente à la blessure, modifications que l'on peut considérer comme liées à une réaction précoce au traumatisme : gonflement du nucléole qui devient intensément colorable, apparition de ~~vacuoles~~ nucléolaires de petite taille, disparition de la coloration des chromocentres (les derniers chromocentres visibles sont ceux de la périphérie nucléaire), disparition de la coloration du nucléoplasme, en particulier autour du nucléole. D'après les résultats antérieurs, ces modifications sont contemporaines d'une pyroninophilie intense, indiquant une forte reprise de la synthèse des ARN. Par contre, les cellules initiant les bourgeons conservent pour une grande part leur aspect initial ou même montrent une accentuation des caractères de cellules métaboliquement peu actives (faible coloration nucléolaire et forte coloration des chromocentres). Après la séparation des explantats, il apparaît donc que la réactivité cellulaire au niveau de l'épiderme, dans la zone de bourgeonnement proche de la blessure, est hétérogène. La constitution de la zone cicatricielle, à laquelle seules les cellules épidermiques banales très proches de la blessure participent, est un phénomène primaire très précoce qui semble précéder la reprise d'activité des zones privilégiées de bourgeonnement. On doit souligner cependant que 19 % des cellules épidermiques contiguës à la cellule basale du poil glanduleux présentent des modifications nucléaires annonçant une reprise d'activité métabolique. Or, 15 % environ des zones d'initiation de bourgeon sont en division après

5 jours (Bigot et Chlyah, 1968). Les cellules donnant naissance aux points caulinaires seraient donc désignées très précocement. Après 48 heures, les cellules épidermiques donnant naissance aux bourgeons n'évoluent pas, alors qu'on note dans les cellules épidermiques banales (Pl. XXVI, fig. 5) la disparition complète des chromocentres, la présence d'une ou plusieurs grandes vacuoles, à contenu peu colorable (en relation probable avec une forte production d'ARN (La Fontaine, 1963 ; Morris-Johnson, 1969) envahissant le nucléole de fort diamètre et une perte de colorabilité du nucléoplasme (possibilité d'une fuite des histones). Dans le parenchyme adjacent à la blessure, certaines cellules, qui participeront à la cicatrisation (premières mitoses à la fin du 2ème jour et au cours du 3ème jour) montrent une très forte affinité du nucléoplasme pour le vert solide FCF et une perte de colorabilité du nucléole : ces cellules sont vraisemblablement dans la phase prémitotique G_2 (Stevens, 1965), l'intense coloration du nucléoplasme pouvant indiquer que le doublement des histones, contemporain de la duplication de l'ADN, s'est effectué (Bloch, 1955 ; Butler, 1963 ; Prescott, 1966). A la suite de ces observations, il est intéressant de souligner la rapidité des réactions nucléaires des cellules épidermiques banales ou parenchymateuses dans le premier millimètre adjacent à la blessure. Une telle précocité dans l'activation nucléolaire a déjà été notée dans les zones de blessures avec la moelle de tabac par Gifford et Nitsch (1969)^{et}, de la même façon, des substances basiques se déposent rapidement autour du nucléole, tandis que les histones quittent le noyau dans un délai bref (1-2 jours). Il ne faut pas perdre de vue que cette réaction, liée à la constitution de l'assise cicatricielle, peut jouer un rôle d'inducteur primaire de la réactivation des zones privilégiées d'initiation de bourgeons. Toutefois, on doit remarquer que cette évolution est relativement limitée dans l'espace (50 à 60 μ). Au delà, les cellules conservent leur aspect initial, ou, en tout cas, ne se divisent pas. Pourtant, les bourgeons peuvent se structurer dans les premiers 2000 μ contigus à la face proximale.

En conclusion, 48 heures après la séparation des explantats, dans la zone de morphogenèse, par leur évolution lente et leur relative stabilité structurale, les cellules épidermiques donnant naissance aux bourgeons constituent une population différente des autres cellules épidermiques. Deux facteurs pourraient être nécessaire à leur reprise d'activité : d'une part, un stimulus mitotique issu de la zone de blessure (auquel elles ne sont pas immédiatement sensibles), d'autre part un stimulus morphogénétique dont l'origine pourrait être le poil glanduleux. Ces résultats ont incité à étudier l'incorporation de la thymidine tritiée dans les premières 48 heures au niveau de la zone de bourgeonnement de façon à connaître la position relative de la phase de synthèse S de l'ADN dans les cellules participant à la cicatrisation et dans les cellules des zones privilégiées d'initiation .

On notera que le nucléole s'est toujours montré colorable par le vert solide FCF. On sait que la présence d'histones dans le nucléole est controversée. Il est admis en tout cas que les ARN ribosomiaux "sortent" du noyau sous forme de ribonucléoprotéines et que l'assemblage ARN-protéines s'effectue pour les 2 sous-unités dans le nucléole. Le fait que la coloration subsiste lorsque l'hydrolyse par le TCA n'est pas réalisée semble indiquer que le nucléole contient des protéines basiques non liées (et peut-être des histones) mises en réserve. L'intensification de la coloration pendant les premières 48 heures montre une augmentation de la synthèse de telles substances, précédant la mitose et accompagnant la synthèse des ARN. Des observations semblables ont été faites par Jalouzot (1969) sur grains de pollen de Lilium candidum et par Gifford et Dengler (1966) sur racines d'oignon. Toutefois Vincent (1952) , dans les cocytes d'étoile de mer, note de grandes quantités de protéines libres dans le nucléole, mais ces protéines ne sont pas basiques (phosphoprotéines) ; leur présence, en tout cas, dépend du stade physiologique de la cellule. Il faut remarquer que le matériel cellulaire étudié ici, complètement différencié (fine pellicule cytoplasmique pariétale) ne permet pas

de juger clairement de la coloration cytoplasmique obtenue par cette méthode .

Enfin, en fonction de certaines expériences relatant l'inhibition de la rhizogenèse d'épicotyles de pois par l'application d'histones, en traitement externes pendant les premières 72 heures (Fellenberg, 1969) ou de la cessation de synthèse des ARN messagers in vitro en présence d'histones, il a été tenté de traiter des explantats au cours du 1er, 2ème, 3ème et 5ème jour suivant l'isolement par trempage dans une solution aqueuse contenant 20 mg/l ou 40 mg/l d'histones de veau (Nutritional Biochemicals Corporation). Les résultats sont donnés dans le tableau 16. La comparaison doit être faite par jour de traitement (explantats issus des 3 mêmes feuilles) ; on constate que la morphogénèse n'a pas été influencée par un tel traitement .

B - Observations concernant l'incorporation de la thymidine tritiée au cours des premières 48 heures .

Le but de cette expérience est de savoir si l'incorporation de thymidine tritiée dans la zone de cicatrisation est contemporaine de celle s'effectuant dans les zones privilégiées d'initiation des bourgeons. En effet, on peut envisager que la reprise d'activité mitotique au niveau de la partie blessée soit l'une des conditions de stimulation des zones de bourgeonnement .

Les résultats de ces observations sont rapportées dans le tableau 17 dont on tirera les conclusions suivantes :

1. Au cours du 1er jour, la thymidine tritiée est incorporée faiblement dans la zone proche de la blessure. Aucune zone privilégiée d'initiation (sur 178 observées) n'est marquée ; il en est de même du cambium. Par contre, le marquage cytoplasmique est intense, marquage qui n'est pas éliminé par 48 heures de lavage à l'eau courante.

TABLEAU 16 - Action d'un traitement par des histones de veau sur la morphogénèse de Begonia rex
(la substance est donnée pendant 24 heures au cours des 5 premiers jours) .

	Moment du traitement											
	1er jour			2ème jour			3ème jour			5ème jour		
	eau	histones 20 mg/l	histones 40 mg/l	eau	histones 20 mg/l	histones 40 mg/l	eau	histones 20 mg/l	histones 40 mg/l	eau	histones 20 mg/l	histones 40 mg/l
Nature du traitement												
Nombre d'explantats	10	25	24	15	13	15	11	13	26	12	10	11
Nombre de racines/explantats	3	2	2	3,5	2,7	1	1,7	1,7	2,2	1,2	1,5	1,2
Nombre de bourgeons/ explantats	11,4	10,7	11,3	13,2	14,3	11,2	11,8	12,7	12,7	9,2	11,2	11

Si la thymidine est donnée par la section distale de l'explantat, le marquage est plus faible au niveau de la zone de blessure proximale. Toutefois, on ignore si la thymidine s'est déplacée d'une manière satisfaisante de la partie distale vers la partie proximale. C'est la raison pour laquelle il a été préféré la plupart du temps un traitement au niveau de cette dernière .

Le marquage cytoplasmique préalable à la synthèse de l'ADN a été déjà observé par Van de Walle et Bernier (1967). Quatre raisons peuvent être invoquées à ce fait :

a - la thymidine est incorporée dans le métabolisme et transformé rapidement en nucléoside triphosphate, plus difficile à éliminer par lavage et piégés éventuellement dans les protéines après la fixation des échantillons .

b - on sait qu'au cours de la dédifférenciation cellulaire, répondant à un traumatisme et conduisant à la mise en place d'une zone cicatricielle, il y a une forte stimulation à la multiplication des mitochondries, donc replication de l'ADN mitochondrial ; l'incorporation de la thymidine dans ces organites est de ce fait possible. Le même phénomène est observé par Lipetz (1967) sur les plastes. Il est vraisemblable que le marquage cytoplasmique peut toujours être noté, mais lorsque le temps d'exposition est calculé pour un marquage discret des noyaux, il échappe en général à l'expérimentateur (Fussel, 1968) .

c - Enfin, la thymidine peut être dégradée très rapidement ; les produits issus de ce catabolisme, réutilisés, peuvent marquer alors diverses structures cellulaires .

d - Il faut rappeler aussi que l'ARN de transfert de l'alanine contient une molécule de ribothymine, dont la synthèse est possible à partir de la thymidine exogène. Toutefois, l'importance d'une telle fixation est vraisemblablement négligeable dans le marquage cytoplasmique .

2. Au cours du 2ème jour (Pl. XXVII), les marquages dans la zone cicatricielle se sont intensifiés et quelques plaques métaphasiques ont été observées. Ces marquages apparaissent dans le cambium et dans la zone périvasculaire . Aucune zone d'initiation des bourgeons (sur 219 observées) n'a incorporé la thymidine .

En accord avec les observations cytologiques rapportées à propos des histones, il apparaît donc clairement que la reprise d'activité de synthèse de l'ADN dans la zone de cicatrisation précède celle des zones privilégiées d'initiation. D'autre part, on note que 24 heures suffisent pour que les cellules soient stimulées à la synthèse de l'ADN et 48 heures pour que les premières mitoses apparaissent. C'est sensiblement le temps de réaction ~~observé~~ par divers auteurs après blessure (Butler et Cohn, 1963, sur foie de rat ; Harding, 1961, sur la cornée ; Lipetz, 1967, sur tige de Kalanchoe ; Yeoman, 1968, sur explantat de topinambour). Enfin on doit souligner la propagation d'une stimulation à la synthèse de l'ADN à partir de la blessure (réactivation progressive des cellules de zones plus éloignées de la zone nécrosée au cours du temps). Ce phénomène a déjà été noté (chapitre IV) à partir de la cellule de base du poil glanduleux et s'accompagne d'une stimulation à la mitose; il est rapporté dans le cas de blessure de la cornée par Harding (1961). Toutefois cette stimulation est de nature inconnue et, selon Yeoman (1968) serait liée étroitement aux produits d'autolyse des cellules de la zone blessée (forte activité phosphatasique au niveau de la nécrose). Il est donc possible d'envisager un stimulus diffusant à partir de la blessure ; l'absence d'incorporation au niveau des zones privilégiées d'initiation au cours des 2 premiers jours montre que celles-ci sont insensibles à ce stimulus et que la reprise d'activité mitotique doit nécessiter un autre contrôle ; par l'utilisation de l'uridine tritiée, il a été tenté de prouver que ce contrôle pouvait être exercé par la cellule basale du poil glanduleux. Toutefois, il faut bien remarquer que l'existence d'une polarité de développement des bourgeons tend à indiquer en apparence

que ni le poil glanduleux, ni la réaction de blessure ne peut expliquer complètement l'induction au bourgeonnement. Il s'y ajoute selon toute vraisemblance, au moins un troisième facteur qui pourrait être la polarisation de la conduction hormonale et nutritionnelle. Cette question sera envisagée dans le chapitre VI. De la même manière, vis-à-vis de la leptotrichogenèse (naissance de poils épidermiques ténus), Arnaud (1970) montre bien, par une analyse minutieuse, que le traumatisme est indispensable à cette néoformation : la naissance de ces leptotriches est postérieure à la formation de la zone cicatricielle chez Begonia rex (cultivar His majesty) et vraisemblablement liée, comme l'indiquent les expériences d'irradiation gamma, à l'établissement de la meresis dans les cellules épidermiques très proches de la blessure, cellules qui participent à la cicatrisation, comme nous l'avons montré aussi. Toutefois, d'autres facteurs (accumulation hormonale par exemple du côté proximal), sont vraisemblablement impliqués, car il y a une stricte polarité de cette néoformation naturelle.

C - Etude de l'incorporation de l'uridine tritiée au cours des 48 premières heures.

Cette expérience a été réalisée dans l'espoir de pouvoir mettre en évidence un enrichissement passager en ARN dans la cellule basale du poil glanduleux précédant une accumulation du marquage dans les cellules qui lui sont contiguës. Les observations rapportées ci-dessous doivent être toutefois considérées comme préliminaires.

1. Mise en place de l'expérience :

En fonction des résultats acquis sur l'apparition des bourgeons, sur l'évolution des histones et sur l'incorporation de la thymidine dans les premières 48 heures après la séparation, le traitement et les prélèvements ont été organisés comme suit, fondés sur la technique habituelle du "pulse-chase".

a - Traitement pendant la première heure suivant la séparation* .

3 lots de 10 explantats, dont 1 lot est fixé aussitôt le traitement ($U_{0/1}$) ; un second lot est fixé après traitement par de l'uridine non marquée à concentration 10 fois supérieure pendant 1 heure ($U_{0/2}$) ; le troisième lot, après ce dernier traitement, est remis au développement pendant 4 heures sur papier filtre, avant d'être fixé ($U_{0/6}$). La technique est basée sur le fait que tous les ARN sont synthétisés d'abord dans le noyau avant de diffuser vers le cytoplasme .

b - Traitement après la septième heure suivant la séparation, sur le même principe ; la fixation du 3ème lot est faite 24 heures après le prélèvement. ($U_{7/1}$, $U_{7/2}$, $U_{7/24}$) .

c - Traitement après la 24ème heure suivant la séparation, dans les mêmes conditions que a ($U_{24/1}$, $U_{24/2}$, $U_{24/5}$) .

d - Traitement après la 48ème heure suivant la séparation, dans les mêmes conditions que a ($U_{48/1}$, $U_{48/2}$, $U_{48/5}$) .

L'uridine tritiée est utilisée à l'activité de $5 \mu\text{C}/\text{ml}$, soit environ à la concentration de 10^{-6} M, compte tenu de l'activité spécifique ; les lavages par l'uridine froide sont réalisés à la concentration de 10^{-5} M . Il a été vérifié qu'à cette concentration, la substance n'a pas d'indidence sur la morphogenèse. Le temps d'exposition a été déterminé par une expérience préliminaire : cinq jours sont satisfaisants pour obtenir un marquage comptable au niveau du noyau. Toutefois, le matériel utilisé est très malcommode pour cette opération. En effet, le noyau est plaqué contre la paroi par le vacuome, ce qui rend difficile

* Explication de la notation : le premier indice indique le moment du traitement par l'uridine tritiée après la séparation de la plante-mère, le second indice désigne le moment de la fixation après ce traitement . Les indices sont exprimés en heures .

l'appréciation exacte de sa forme. D'autre part, il n'y a pas plus d'une zone privilégiée d'initiation toutes les 3 coupes, ce qui oblige à observer systématiquement un grand nombre de préparations. Enfin, le marquage du cytoplasme pariétal est difficile à observer .

2. Contrôle du marquage .

Dans une telle expérience, il faut s'assurer que les grains d'argent dénombrés correspondent bien à l'uridine incorporée dans les ARN ; les contrôles de marquage sont donc d'une importance extrême . On peut procéder à l'élimination du ma rquage soit par la ribonucléase (Ribonucléase cristalline 5 X de NBC) suivant la technique classique préconisée par Jensen (1962) et mise au point par Brachet en 1953, soit, par l'action de l'acide perchlorique à 10 % à 4° C pendant 18 heures (extraction des ARN seuls) (Lison, 1960) .

D'autre part, l'uridine peut être convertie en déoxyuridine monophosphate, puis en acide thymidylique par la thymidylate synthétase ; si les cellules sont en phase S, il existe donc une possibilité de fixation de l'uridine dans l'ADN, marquage qui résiste à l'action de la ribonucléase. Certains auteurs, comme Coming (1965), préconisent un traitement à la déoxyribonucléase (100 μ g/ml) avant le dénombrement des grains, de façon à éviter cette cause d'erreur ; il faut remarquer que celle-ci est négligeable si la substance est donnée dans de l'uridine froide à concentration 10 fois supérieure .

Enfin, il est possible, pour un contrôle par différence, d'utiliser une extraction commune des ARN et ADN soit par l'acide trichloracétique à 5 % à 90° C pendant 20 minutes (Morris-Johnson, 1969) ou par l'acide perchlorique à 10 % à 70° C pendant 20 minutes .

Signalons qu'un marquage parasite résiste aux procédés précédents, dû à la présence d'uridine sous forme de mono-, di- ou

triphosphates piégés au moment de la fixation des objets, même après un lavage prolongé. La méthode d'élimination de ces composés est donnée par Tandler et La Torre (1966) .

Les résultats des contrôles de marquage (Pl. XXVIII) sont donnés ci-dessous ; ils ont été réalisés en particulier dans le cas de coupes fortement marquées après la 48ème heure ; la figure 7 représente le marquage témoin avant l'application des traitements .

a - La ribonucléase (fig. 2) extrait le marquage, sauf quelques grains dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme. Dans ce dernier cas, il faut penser que les mitochondries et les plastes sont capables de faire la synthèse de certains ARN et que la ribonucléase ne pénètre pas dans ces organites .

b - L'acide perchlorique 10 % à 4° pendant 18 heures donne des résultats analogues à l'action de la ribonucléase (fig. 1) .

c - Tout le marquage est extrait par l'action de l'acide trichloracétique 5 % à 90° ou l'acide perchlorique 10 % à 70° C pendant 20 minutes (fig. 3, 4 et 5). Si on compare au résultat précédent, il est possible de penser qu'une faible fraction de l'uridine a été convertie en acide thymidylique à la 48ème heure, moment où la synthèse de l'ADN s'effectue dans la zone cicatricielle .

Etant donné le faible marquage résiduel après action de la ribonucléase, le contrôle préconisé par Tandler et La Torre n'a pas été fait.

En conclusion, on peut penser que les marquages observés portent bien sur la synthèse des ARN. Le bruit de fond de l'émulsion s'est révélé négligeable .

3. Résultats préliminaires .

Les résultats sont réunis dans le tableau 18 et illustrés par les planches XXIX et XXX auxquels il faut joindre les observations suivantes :

a. Aussitôt après le prélèvement et après 1 heure de contact ($U_{0/1}$) le marquage est sensiblement équivalent dans les cellules basales des poils glanduleux, les cellules épidermiques adjacentes à ces dernières et les cellules épidermiques banales ; les cellules parenchymateuses incorporent mieux l'uridine. Leur activité de synthèse de l'amidon peut expliquer ce fait. Les grains d'argent sont localisés dans tous les cas au-dessus du nucléoplasme et jamais au-dessus du nucléole . La synthèse des ARN ribosomiaux est donc probablement faible . Le marquage cytoplasmique est très faible ou nul .

Le transfert dans l'uridine froide ($U_{0/2}$ - Pl. XXIX, fig. 1 à 4) ne modifie pas la répartition du marquage. On peut seulement noter la présence de quelques grains périnucléaires ; on observe aussi un début de gonflement nucléolaire dans les cellules de la zone de cicatrisation, réaction par conséquent très précoce. Les coupes très éloignées de la zone de blessure montrent une incorporation plus faible .

Après 6 heures, le marquage au-dessus du nucléoplasme est toujours présent ; le nombre de grains périnucléaires paraît un peu supérieur : on voit donc que la diffusion de marquage obtenu à la 1ère heure vers le cytoplasme s'effectue très lentement .

b - 7 heures après le prélèvement, après 1 heure de contact et 1 heure de passage dans l'uridine froide ($U_{7/2}$, Pl. XXIX, fig. 5 à 8), on observe dans certaines cellules parenchymateuses une incorporation très forte (> 30 grains) au niveau du nucléole et dans le nucléoplasme. Le gonflement du nucléole et, pour certaines cellules, l'accumulation d'amidon autour du noyau dénotent une reprise d'activité métabolique

TABLEAU 18 - Résultats préliminaires concernant l'incorporation de l'uridine tritiée au niveau des noyaux, au cours des premières 48 heures après la séparation (explication des traitements dans le texte). Dans chaque rubrique (cell. basales,...), le premier chiffre indique le nombre de noyaux observés, le second, le nombre moyen de grains d'argent par noyau.

Traitements	Zone contiguë à la blessure proximale (0-750 μ)							Zone éloignée de la blessure (> 2500 μ)				
	cell. basales		cell. adjacentes		cell. épид. banales		cell. parench.	cell. basales		cell. adjacentes	cell. épид. banales	cell. parench.
U _{0/1}	13	10	31	10	45	13	30	23				
U _{0/2}	6	10	54	10	98	15	34	20	1	10	6	Faible
U _{0/6}	12	10	41	8	95	12				6	30	Faible
U _{7/2}	6	8	25	11		13	27	> 30		16	4	Faible
U _{7/24}	1	7	6	5	33	5		faible				
U _{24/1}	1	7	18	22	101	> 30	54	> 30			très faible	très faible
U _{24/2}			13	12	35	> 30	15	> 30				
U _{48/1} *	2	12	9	3		> 30		> 30				
U _{48/2} *	1	14	5	2		> 30		> 30			très faible	très faible
U _{48/5}											très faible	très faible

* Dans ces rubriques, les noyaux à faible marquage ont été séparés des noyaux à fort marquage.

et en particulier une mobilisation de l'énergie. Ces cellules sont donc déjà activées et la synthèse des ARN ribosomiaux semble avoir repris. Par contre, les autres cellules n'ont pas cette réaction ; le faible nombre de cellules basales de poils glanduleux observées ne permet pas de conclure sur une incorporation privilégiée à leur niveau .

L'homogénéité de l'incorporation dans les cellules parenchymateuses est notable. La blessure provoque donc une synchro-nisation métabolique dans les noyaux quiescents, conduisant dans un délai bref (entre 24 et 48 heures), à la première mitose, ce qui pourrait présenter un intérêt dans la détermination des facteurs de l'induction à la meresis. La reprise de synthèse est précoce, ce qui est à rapprocher des résultats obtenus, dans un laps de temps bien plus bref il est vrai, par Gigot et collab. (1968) sur le marquage rapide d'ARN foliaires de Brassica après isolement des feuilles de la plante mère. Toutefois l'observation des coupes éloignées de la zone de la blessure indique une faible incorporation d'uridine ; le détachement de la feuille ne provoque, dans ce laps de temps, aucune reprise de la synthèse des ARN dans le limbe ; ceci est lié comme on le verra à une faible incorporation d'acide aminé, déjà rapporté par Hirth (1958) et Chibnall (1954). En conclusion, la zone adjacente à la blessure et le reste du limbe présentent des réactions très différentes après l'isolement .

17 heures après la mise en contact, le marquage est très faible au niveau des noyaux des diverses catégories de cellules, sans qu'on puisse mettre en évidence un marquage cytoplasmique. Il est donc possible que l'intensification de l'incorporation notée après la 9ème heure ($U_{7/2}$) corresponde en grande partie à des ARN instables ayant une fonction messagère .

c. 24 heures après le prélèvement ($U_{24/1}$, Pl. XXX, fig. 1). Il apparaît un très fort marquage soit au-dessus du nucléole (très

vacuolisé), soit dans la zone périnucléolaire. Les grains d'amidon sont souvent regroupés autour du noyau, et le marquage cytoplasmique ou plastique s'est nettement intensifié dès que l'on s'éloigne de la zone de blessure. Les cellules adjacentes à la base du poil glanduleux restent inertes, ce qui est en accord avec les observations sur les histones. Les régions situées au delà de $2500\ \mu$ de la blessure n'incorporent pas le précurseur.

Après un contact d'une heure avec l'uridine froide ($U_{24/2}$), le marquage est toujours très intense au-dessus du nucléole, mais on peut distinguer un accroissement de l'incorporation périnucléaire indiquant peut-être une fuite du marquage vers le cytoplasme.

Enfin, on a pu remarquer la présence de quelques noyaux de cellules parenchymateuses non marquées, à nucléole très gros et très vacuolisé. En accord avec les résultats obtenus dans l'étude des protéines basiques et de l'incorporation de la thymidine tritiée, il est possible que ces cellules soient en phase G_2 préprophasique. On admet en effet que la synthèse des ARN s'arrête après celle de l'ADN (Hsu, 1962), avant la disparition du nucléole (Prescott et Bender, 1962), disparition qui annonce la prophase.

d - 48 heures après le prélèvement ($U_{48/1}$, Pl. XXX, fig. 2 à 4), le nombre des noyaux non marqués dans le parenchyme augmente (fig. 6), ce qui est corrélatif de l'intensification du marquage par la thymidine. Quelques mitoses sont bien visibles ; elles ne sont pas marquées, ce qui est en accord avec les observations montrant l'arrêt complet de la synthèse des ARN pendant la mitose. Comme nous l'avons montré à propos des histones, il semble s'amorcer deux populations de cellules adjacentes au poil glanduleux, cellules responsables de la formation des bourgeons : en effet, certaines d'entre elles sont fortement marquées (nombre de grains > 30). Le marquage des cellules dans la

zone de bourgeonnement a sensiblement les caractères observés après 24 heures (accumulation de grains d'argent au-dessus du nucléole et accroissement progressif du nombre de grains dans le cytoplasme, notamment à la cinquième heure suivant la mise en contact avec l'uridine marqué (Pl. XXX, fig. 5) .

4. Conclusion .

Le but de cette expérience était de mettre en évidence une accumulation momentanée de marquage dans la cellule basale du poil glanduleux, accumulation précédant l'activation des cellules épidermiques donnant naissance aux bourgeons. Pour diverses raisons d'ordre technique (nécessité d'un très grand nombre de coupes pour des observations statistiques des cellules basales du poil glanduleux, difficulté d'apprécier réellement le marquage dans ces cellules de petite taille, détérioration partielle de l'épiderme supérieur dans un certain nombre de coupes) nous ne pouvons conclure à ce sujet, mais l'expérience pourrait être reprise suivant des modalités un peu différentes. Néanmoins les résultats de marquage par l'uridine tritiée confirment toutes les autres observations : après la séparation, dans la zone de blessure, il y a un retour rapide à une activité de synthèse des ARN (en particulier nucléolaire) lié à une reprise précoce de la meresis (24 à 48 heures). Cette activité est entrêment localisée; l'ensemble du fragment accuse, en effet, après la séparation, une réduction du métabolisme. Après 48 heures, quelques zones privilégiées d'initiation sont activées et pourraient être à l'origine des points caulinaires . Toutefois cette réaction est plus tardive que celle des cellules parenchymateuses ou épidermiques proches de la section, ce qui confirme l'hypothèse qu'un seul facteur lié à la blessure n'est pas suffisant pour expliquer leur reprise d'activité . Notons enfin que l'on peut observer un pic de synthèse d'ARN (35 à 55S) 2 heures après la séparation d'explantats de carotte, puis, après 7 heures, un pic de synthèse d'ARN ribosomaux contemporains d'une hypertrophie nucléolaire (Lacharme et Netien, 1970). Ce résultat est à rapprocher du nôtre .

D - Isolement physiologique des cellules basales des poils glanduleux .

Pour tenter de déterminer le rôle de la cellule basale du poil glanduleux dans l'activation des cellules épidermiques, un autre type d'expérience a été réalisé, en tentant de couper les plasmodesmes entre les 2 types de cellules ; au cours des premiers jours, on peut espérer ainsi interrompre à un moment donné les échanges de "messages" entre ces cellules. Ces messages peuvent être bien entendu des inducteurs différents des acides nucléiques .

1. Action de l'acide glycocholique .

A la suite des expériences de Clark (1938), on a admis que cette substance pouvait bloquer le transport de l'auxine, conclusion confirmée par Champagnat et Pigeret (1957), et van Overbeek (1956). Toutefois l'utilisation d'AIA-¹⁴C (Vardar et Denizci, 1962) contredit cette opinion. Selon Jacobs (in Vardar, 1968) l'effet de cette substance sur la croissance, pourrait être lié à la contraction des plasmodesmes, interrompant les liaisons intercellulaires. Les protoplastes ainsi isolés restent vivants et les courants cytoplasmiques ne sont pas annulés. Il y aurait donc là un moyen expérimental d'interrompre les corrélations entre les cellules .

Les explantats foliaires ont été traités par des solutions d'acide glycocholique à 10 mg/l et 100 mg/l pendant les 7 premières heures, puis de la septième à la vingt quatrième heure, pendant les 24 premières heures et après 24 heures. Les résultats sont réunis dans le tableau 19 .

La substance appliquée à la concentration de 100 mg/l, a toujours diminué le nombre de bourgeons et de racines et provoqué une réduction nette de la croissance des limbes. Par contre en comparant les

TABLEAU 19 - Action de l'acide glycocholique, appliqué au cours des deux premiers jours après la séparation sur la morphogénèse caulinaire et racinaire d'explantats foliaires de Begonia rex.

Nature du traitement	témoin dans l'eau	solution d'acide glycocholique à 10 mg/l				solution d'acide glycocholique à 100 mg/l			
		7 premières heures	de 7 à 24 heures	premières 24 heures	de 24 à 48 heures	7 premières heures	de 7 à 24 heures	premières 24 heures	de 24 à 48 heures
Moment du traitement									
Nombre d'explantats	13	13	13	13	12	13	13	14	13
Nombre de bourgeons / explantat	10	11,4	8,3	<u>6,1</u>	10,3	7	8,1	3,8	5
Intervalle de confiance de la moyenne	+ 2,3 - 2,3	+ 2,3	+ 2,1	+ 0,8 - 0,8	+ 2,3 - 2,3	+ 1,7 - 1,7	+ 2,2 - 2,2	+ 1,6 - 1,6	+ 1,6 - 1,6
Nombre de racines / explantat	2,1	1	3,5	1	2	3,6	2,8	0,7	0,8
Indice de dominance	1	1	1	1	1	0,9	1	1	0,7

résultats obtenus pour le témoin (traité à l'eau pendant 24 heures) et pour les séries de traitement à l'acide glycocholique à la concentration de 10 mg/l, on note une action dépressive sur le bourgeonnement pendant les premières 24 heures, action qui n'est pas sensible au cours du 2ème jour suivant l'isolement. Si l'action de cette substance est bien de provoquer une rupture des liaisons cytoplasmiques entre les cellules voisines (ce qui est très difficile à mettre en évidence dans notre matériel), on pourrait donc penser qu'il y a un "conditionnement" des cellules responsables du bourgeonnement pendant les premières 24 heures, soit par la cellule de base du poil glanduleux, soit par les autres cellules de l'explantat. L'expérience ne permet pas en effet de décider du sens du conditionnement.

2. Action du mannitol .

Le mannitol, polyalcool peu assimilable par les végétaux supérieurs, permet de maintenir une pression osmotique sensiblement constante dans le milieu de culture. Il a été employé ici dans l'espoir de rompre les communications cytoplasmiques entre la cellule basale du poil glanduleux et les cellules qui lui sont adjacentes . De façon à limiter le "choc" osmotique, les explantats sont traités par des solutions de molarité croissante (0,2 M ; 0,4 M ; 0,6 M) pendant une heure, puis laissés en présence d'une solution 0,8 M pendant deux heures. La déplasmolyse s'effectue sur le même principe. Les explantats sont ensuite traités pendant 12 heures soit par l'eau, soit par la benzylaminopurine à la concentration de 10^{-4} M . Les applications sont effectuées au cours du 1er, 2ème, 3ème et 4ème jour. Par prélèvement des fragments épidermiques, nous avons vérifié que la plasmolyse s'effectue comme prévu tant dans les cellules épidermiques banales (Pl. XXXI, fig.1) que dans les cellules contiguës à la base du poil (Pl. XXXI, fig.2 et 3). Toutefois, dans certains cas (Pl. XXXI, fig.4) le contact peut être maintenu entre les protoplastes d'une cellule adjacente responsable de l'établissement d'un bourgeon et la cellule basale du poil. Les résultats de l'expérience (tableau 20) montrent que le mannitol produit une dépression sur le

TABLEAU 20 - Action du mannitol à la concentration de 0,8 M, appliqué au cours des 4 premiers jours (J_1 , J_2 , J_3 , J_4) après la séparation, sur la caulogénèse chez Begonia rex. (processus expérimental décrit dans le texte).

Traitements	Témoin traité par l'eau				Mannitol, puis eau				Mannitol, puis benzylaminopurine			
	J_1	J_2	J_3	J_4	J_1	J_2	J_3	J_4	J_1	J_2	J_3	J_4
Moment du traitement												
Nombre d'explantats	13	13	12	13	22	13	12	12	12	14	11	11
Nombre d'explantats avec bourgeons	13	13	12	13	22	6	3	6	11	13	7	11
Nombre d'explantats présentant des bourgeons non polarisés	0	0	0	0	2	1	0	2	11	13	7	11

bourgeonnement lorsqu'il est donné au cours du 2ème, 3ème et 4ème jour. Cette dépression est plus nette au 3ème jour, tandis qu'aucun effet n'est noté après un traitement au cours du 1er jour. La benzylaminopurine rétablit l'aptitude à la caulogénèse. On remarquera toutefois les bourgeons sont peu vigoureux et certains explantats partiellement nécrosés.

Signalons qu'en application continue, le mannitol a une action dépressive (3×10^{-2} M) ou totalement inhibitrice (0,1 M environ) sur la néoformation de bourgeons à partir de fragments de tige de Plumbago indica ; cette action est réversée par le saccharose (C. Nitsch, 1967) . Les résultats d'Homes (1967) sur l'action comparée de glucose, du saccharose et du mannitol sur les tissus embryogènes de carotte indiquent que ce dernier, même à des concentrations faibles (0,5 %) empêche leur développement. L'addition de glucose permet une croissance normale ; le mannitol n'a donc pas d'action toxique .

La plasmolyse provoque des perturbations importantes dans le métabolisme ; on sait que le mannitol est couramment utilisé dans les milieux de culture pour éviter l'éclatement des protoplastes isolés lorsque la tonicité de la solution est trop faible ; à ce propos Schenk et Hildebrandt (1969) montrent par exemple que des pressions osmotiques trop élevées affaiblissent les courants cytoplasmiques, ce qui peut entraîner la mort de ces organismes. Maretzi, Thom et Nickell (1969) indiquent qu'un accroissement de la pression osmotique, d'une valeur de 2 atmosphères, au-dessus de la tonicité d'un milieu normal entraîne une diminution de la croissance, puis, à partir de 5 à 6 atmosphères, une diminution de l'incorporation de glucose ^{14}C et une réduction du pool des acides aminés libres pour des suspensions cellulaires de canne à sucre. Ces phénomènes sont réversibles lorsqu'on revient au milieu de culture normal. Il faut souligner qu'une solution de mannitol 0,8 M correspond à une pression osmotique de 18 atmosphères et que la plasmolyse commence dans le cas de

Begonia rex à la concentration de 0,4 M. Enfin, Cocking (1965) rapporte que ce phénomène peut entraîner une rupture au niveau de la pellicule cytoplasmique externe (plasmalemmes), qui est ainsi séparée du protoplaste, séparation provoquant des lésions irréversibles. Ces raisons font que la dépression du bourgeonnement obtenue après action du mannitol ne peut être rapportée avec certitude à une interruption des corrélations entre la cellule basale et les cellules assurant la formation des bourgeons. Cette certitude ne pourrait être acquise qu'après un contrôle par la microscopie électronique. Le fait toutefois que le nombre d'explantats avec bourgeons soit plus faible lorsque le traitement est effectué au 3ème jour indique qu'à ce moment il s'établit un métabolisme dont le bourgeonnement dépend plus particulièrement, fait qui sera confirmé dans le chapitre VII par l'utilisation des antimétabolites en application séquentielle. Ce résultat n'est pas tout à fait en accord avec le précédent; il ne faut pas perdre de vue que l'action de l'acide glycocholique sur la rupture des ponts cytoplasmiques n'a pas été jusqu'à maintenant clairement démontrée.

E - Contrôle de la protéogenèse au cours des 48 premières heures.

La stimulation de la protéogenèse, indispensable à la reprise d'activité mitotique est un élément important de la réactivation cellulaire. Dans la zone de morphogenèse, on a tenté par l'incorporation d'un précurseur marqué de préciser une relation entre ce métabolisme et la reprise des premières mitoses dans les zones privilégiées de bourgeonnement. La lysine tritiée a été choisie dans l'espoir de préciser le moment de la synthèse des histones soit dans la zone cicatricielle, soit dans les cellules donnant naissance aux bourgeons. D'après les résultats obtenus avec la thymidine tritiée, aucun marquage ne devrait être observé dans ces dernières, si on admet que les synthèses des histones et de l'ADN sont contemporaines.

L'autohistoradiographie ne permet pas de juger exactement de l'activité de protéogenèse de la cellule ; on élimine en effet au cours du traitement des coupes (fixation et déshydratation), une fraction importante des substances azotées solubles (acides aminés et polypeptides de faible poids moléculaires), dont on ne peut connaître ainsi le bilan. De plus, le fixateur est à prendre en considération ; le formol est un bon fixateur des protéines (Gabe, 1968), et, à cet égard, le F.A.A. est convenable, malgré la présence d'acide acétique (perte de protides cytoplasmiques de poids moléculaire élevé, mais bonne fixation au niveau du noyau). La lysine tritiée a été employée à la dose de $3 \mu\text{C}/\text{ml}$, absorbée par la section proximale. Après un traitement d'1 heure, la lysine non radioactive à une concentration 10 fois plus élevée (soit environ $2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) a été fournie aux explantats. Le traitement a été fait 2 heures, 18 heures, 24 heures, 48 heures après la séparation et la fixation effectuée aussitôt après. Un contrôle du marquage a été tenté par extraction à l'acide chlorhydrique dans les conditions suivantes : HCl N à 60° C pendant 15' . HCl N à 60° C pendant 30', HCl 5 N à 15° C pendant 4 h. , HCl 5 N à 15° C pendant 16 h. Seul, l'HCl N à 60° C pendant 30' a permis d'extraire le marquage à peu près complètement pour les séries fixées après 2 heures et 48 heures, partiellement pour les autres séries. Cette différence dans l'extractibilité du marquage pourrait refléter une différence dans la nature des protéines produites ; toutefois, cette hypothèse est à confirmer, car les solubilisations différentielles de protéines sont en général peu convaincantes (Gabe, 1968). Il faut se rappeler d'autre part que la coagulation et la dénaturation des protéines provoquées par le fixateur rendent souvent leur hydrolyse plus difficile (Gabe, 1968) .

D'une manière générale, après 3 jours d'exposition, le marquage au niveau de la section proximale est très intense dans le cytoplasme pariétal (nul dans le vacuome); il est impossible par cette méthode de déceler réellement une différence entre la zone parenchymateuse, l'épiderme et la zone d'initiation. D'autre part, le cytoplasme périnucléaire

masque tout marquage spécifique du noyau ; avec le même précurseur, Erresa et collab. (1961) et Mattingly (1963) font les mêmes observations ; ce dernier auteur préconise l'utilisation des noyaux isolés pour suivre la synthèse des histones .

Il est à noter dans tous les cas de traitement que le marquage s'atténue et disparaît presque complètement (Pl. XXXII, fig. 2 et 4) dans les coupes éloignées de la zone de blessure (2000 à 2500 μ). Ce résultat est important car il apparaît que la majeure partie de l'explantat n'est pas réactivée au cours des 48 premières heures, la stimulation de la protéogenèse ne s'effectuant qu'au niveau d'une bande tissulaire étroite adjacente à la blessure. Cette observation a déjà été faite par Mitchell (1968) avec des explantats de topinambour ; avant la phase S, les cellules de la périphérie accumulent des protéines, même si elles n'entrent pas en division ; par contre, les cellules du centre de l'explantat restent inertes. Le résultat rapporté confirme des observations précédentes que nous rappelons : aucune reprise d'affinité à la pyronine, aucune évolution cytologique au niveau du noyau, faiblesse de l'incorporation d'uridine tritiée, aucune incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules éloignées de la zone lésée, situées au delà de 2000 μ .

On ajoutera que la stimulation rapide de la protéogenèse 2 heures après la séparation peut être liée en partie à la multiplication des mitochondries dans la zone de blessure (Pl. XXXII, fig. 1). Il a été en effet noté dans de nombreux cas une stimulation respiratoire suivant la séparation d'un organe (Yarwood, 1946) .

Cette hypothèse est étayée par le fait qu'aucune différence dans l'incorporation de l'uridine tritiée n'est décelée entre les zones proches et éloignées de la blessure pendant les 2 premières heures. Le collenchyme sous-jacent à l'épiderme supérieur est plus intensément marqué ce qui dénote une plus grande activité métabolique. Après 24 heures (Pl. XXXIII, fig. 2), le marquage s'est intensifié dans les cellules paren-

chymateuses ; la densité des grains est bien plus grande au niveau du noyau, ce qui peut résulter de deux phénomènes : accumulation de ribosomes ou d'organites autour du noyau, indiquant une activité particulièrement intense (regroupements des grains d'amidon fréquents après 48 heures) ou superposition d'un marquage nucléaire et cytoplasmique. Toutefois, il est impossible de déterminer par cette méthode le moment où s'effectue la synthèse des protéines basiques, repérée après 24 heures dans le nucléole et après 48 heures dans le nucléoplasme par la méthode de coloration au vert solide FCF. Après 48 heures, l'incorporation s'est nettement intensifiée (Pl. XXXIII, fig. 3 et 4) .

En conclusion, l'autohistoradiographie de coupes effectuées au niveau de la section proximale après incorporation de lysine tritiée, montre :

- 1 - la stimulation rapide de la protéogénèse dans la zone de blessure, activité s'intensifiant avec le temps .
- 2 - la faible incorporation dans les cellules éloignées de la zone lésée, cellules qui ne semblent donc pas réagir après la séparation des explants.

F - Conclusions .

Les résultats des observations précédentes sont réunies dans le tableau 21. Les faits importants à noter sont les suivants :

1° L'activation des cellules proches de la blessure est très rapide. En effet :

- a. Dans les premières 24 heures après la séparation, il y a :
 - augmentation de la synthèse des ARN, mesurée par la pyroninophilie et l'incorporation d'uridine tritiée (nucléole et nucléoplasme).
 - disparition de l'affinité des chromocentres pour le vert solide FCF (Fast green), correspondant probablement à une despiralisation de la chromatine et peut-être à une remise en activité de gènes.

- intensification de l'affinité du nucléole pour le vert solide FCF (Fast green), dénotant une accumulation de protéines basiques, en liaison avec la synthèse des ARN qui sortent du noyau sous forme de ribonucléoprotéines .

- gonflement et vacuolisation du nucléole .

b. 48 heures après la séparation, les divisions sont amorcées dans la zone de cicatrisation .

2°. Les zones privilégiées d'initiation restent inertes pour la plus grande part. Elles ne sont donc pas immédiatement sensibles à l'interruption des corrélations avec la plante mère. Toutefois, certaines d'entre elles commencent à évoluer comme le montre les caractéristiques de la coloration au Fast-green, sans atteindre le point de mitose .

3°. L'étude cytologique met en évidence la localisation significative des noyaux des cellules qui initient les bourgeons, noyaux situés contre la cellule basale des poils glanduleux. Il n'est donc pas exclu que cette dernière exerce un contrôle sur l'activité mitotique et organogène des cellules contiguës. Les expériences préliminaires utilisant l'uridine tritiée, incorporée au cours des 48 premières heures n'ont pas permis de vérifier la présence d'un "message" entre ces cellules. S'il existe, ce message peut être très fugace ou plus tardif .

D'après ces résultats, il semble donc que les cellules épidermiques adjacentes aux poils glanduleux constituent un groupe différent des autres cellules épidermiques .

Il manque à cette étude les expériences permettant de localiser dans le temps la phase de synthèse de l'ADN dans les cellules donnant naissance aux bourgeons. D'après ce que nous avons dit dans le chapitre IV, cette phase doit se situer entre le 3ème et le 4ème jour et cette précision supplémentaire sera rapportée dans le chapitre VII. Pour terminer, nous

attirons déjà l'attention sur la nécessité de la blessure dans l'induction de la morphogenèse naturelle. Il nous paraît nécessaire d'attacher dans l'avenir plus d'importance à une étude précise de l'établissement de la zone cicatricielle, en particulier pour connaître exactement les étapes métaboliques qui mènent d'une cellule différenciée quiescente à une cellule capable de se diviser .

TABLEAU 21 - Intensité des colorations et des incorporations au niveau des noyaux au cours des 2 premiers jours après la séparation des explants dans la zone de bourgeonnement (section proximale).
(F.G. : Fast green ou vert solide FCF)

Moment de l'observation et techniques		Zone de cicatrisation (0 à 300 µ de la blessure)					Zone de bourgeonnement (300 - 2000 µ de la blessure)			
		parenchyme	cell. épид. banales	cell. épид. adjacentes	cell. basales des poils glanduleux		parenchyme	cell. épид. banales	cell. épид. adjacentes	cell. basales des poils glanduleux
A l'instant de la séparation	Pyronine	+	+	+	+++		+	+	+	+++
	F.G. (nucléole	+++	+++	+++	+++		+++	+++	+++	+++
	Uridine ³ H	+	+	+	++		+	+	+	++
	Thymidine ³ H	++	+	+	+		++	+	+	+
		0	0	0	0		0	0	0	0
1 jour après la séparation	Pyronine	+++	+++	+	+++		+	+	+	+++
	F.G. (chromocentres	+	+	+++	+++		+++	+++	+++	+++
	Uridine ³ H	+++	+++	+	++		+	+	+	++
	Thymidine ³ H	+++	+++	+	?		+	+	+	?
		+	+	0	0		0	0	0	0
2 jours après la séparation	Pyronine	+++	+++	+	+++		++	+	+	+++
	F.G. (chromocentres	0	0	+++	+++		++	++	+++	+++
	Uridine ³ H	+++	+++	+	++		++	++	+	++
	Thymidine ³ H	+++	+++	+	?		++	+	+	?
		<u>division</u>	<u>division</u>	0	0		0	0	0	0

CHAPITRE VI

POLARITE NATURELLE ET CAULOGENESEI - INTRODUCTION

La polarité de régénération est une propriété bien établie chez les végétaux supérieurs, liée vraisemblablement à leur bipolarisation, étudiée pour la première fois par Vöchting en 1878, à propos de l'enracinement de fragments de tiges d'espèces ligneuses. Malgré de nombreuses études, analysées par divers auteurs (Bloch, 1965 ; Champagnat, 1961 ; Gautheret, 1959 ; Sinnott, 1960) aucune théorie n'est susceptible d'expliquer d'une manière satisfaisante le phénomène de la polarité. Un compromis entre ces diverses théories, souvent trop exclusives, doit être recherché pour expliquer la polarité d'un organe végétal. Rappelons brièvement les raisons invoquées au cours du dernier siècle :

1. La première théorie, émise par Vöchting, en 1878, exprime que la polarité de l'organe est la somme des polarités cellulaires, polarités irréversibles et liées à la structure moléculaire. On connaît en effet des organismes unicellulaire pour lesquels la cellule mère transmet la polarité à la cellule fille. Dans d'autres cas, la polarisation est induite par le phénomène de fixation ; elle est très stable, comme cela a été montré pour l'*Acetabularia*, algue verte unicellulaire (Puisieux-Dao, 1965), dont les capacités de régénération sont liées à l'établissement de gradients morphogénétiques évoluant avec le stade de différenciation de l'algue ; on a pu enfin déceler des exemples de polarité cytoplasmique, d'orientation

privilégiée du phragmosome dans les divisions cellulaires, de mitoses inégales (mise en place des stomates), de distribution polarisée des plastes (Sinnott et Bloch, 1940). Tous ces éléments sont des arguments pour un rôle "cellulaire" dans la polarité, mais on imagine mal comment biologiquement peut s'effectuer la sommation des polarités cellulaires .

2. Sachs en 1880, reprenant une théorie plus ancienne de Duhamel du Monceau, imagine l'existence de substances organo-formatrices à circulation polarisée. La découverte des hormones végétales (auxines, puis cytokinines) apporta beaucoup plus tard une preuve éclatante de son intuition .

3. Goebel en 1900 fait intervenir des courtants circulatoires privilégiés déterminés par des organes en voie de croissance active et dont le sens fixerait la polarité . C'est donc le rôle des appels mdéculaires qui serait prédominant .

4. Après les idées émises par Loeb (1920), concernant la polarité anatomique, et par Went (1932), pour lequel le potentiel électrique est un élément important dans ce phénomène (diminution de la racine vers la tige), la découverte de la polarisation de circulation des auxines fit considérer ces substances comme un agent déterminant dans la polarité de morphogenèse (Gautheret, 1944, 1959 ; Bouillenne, 1964) .

5. La découverte des cytokinines apporte un élément nouveau (Skoog, 1955) : l'orientation de la morphogenèse est déterminée par un équilibre relatif des 2 types de substances ; cet équilibre est en fait défini dans un fragment d'organe par l'hormone dont la circulation est polarisée, c'est-à-dire l'auxine. Notons qu'une culture de tissu est mal adaptée, par suite de sa prolifération anarchique, à l'étude du déterminisme de la polarité. D'une manière naturelle, la circulation basipète privilégiée des auxines entraîne

un enrichissement en ces substances au niveau de la partir basale, c'est-à-dire au pôle racinaire. Malheureusement, des explantats foliaires se comportent tout à fait différemment, puisque dans tous les cas étudiés, la morphogenèse racinaire et caulinare s'effectue à un seul pôle, la section proximale ou pétiole. Il y a donc là une différence essentielle avec des fragments de tige ou de racine .

6. Enfin, comme le souligne Champagnat (1961), il est indispensable de faire intervenir les corrélations d'inhibition dans le problème de la polarité de néoformation .

Dans le matériel étudié, il a été tente de déterminer les causes de la polarité particulière de fragments foliaires (comparativement à ce qu'on observe dans la tige ou la racine), par des méthodes physiques (par exemple réactions d'explantats après un redécoupage dans le temps) ou par des méthodes chimiques limitées à l'extraction de substances hormonales, de façon à analyser :

1. le rôle de la dominance (corrélations internes et courants métaboliques privilégiés),
2. le rôle du transit auxinique (modification apportée par l'acide triiodo-benzoïque et l'acide phtalamique),
3. le rôle du transit nutritionnel (interruption des vaisseaux),
4. le rôle de la nervure,
5. l'épuisement des facteurs de morphogenèse dans le temps,
6. les relations entre la morphogenèse polarisée et le déséquilibre des substances hormonales naturelles aux deux pôles du fragment .

Enfin, une étude histologique restreinte de la section distale a été faite en fonction des résultats obtenus pour la section proximale. Par contre les résultats de l'étude pharmacodynamique du phénomène (trouble de la

polarité éventuellement provoqué par l'application externe de substances stimulant ou inhibant la morphogenèse) sont réunis dans le dernier chapitre de cette étude .

II - ETUDE DE L'ACTION D'UN TRAUMATISME PHYSIQUE SUR LA POLARITE DE MORPHOGENESE .

A - Mise en évidence de la polarité par découpage des feuilles (Bigot, 1965) .

1. Tronçonnement de feuilles (Pl. XXXIV, fig. 1)

Comme le montre la figure, les bourgeons néoformés apparaissent au niveau des sections proximales de toutes les nervures, les plus vigoureux se situant au niveau des nervures principales. Exceptionnellement sur des explantats de grande taille, quelques points caulinaires se sont formés en dehors des zones blessées, toujours le long des nervures. La rhizogenèse par contre n'est pas polarisée sur de tels explantats. L'étude histologique précise a bien montré que les bourgeons sont initiés avant les racines. Il est impossible de dire si les premiers ont une action stimulante sur les seconds bien que dans les expériences d'inhibition du bourgeonnement (chapitre VII), il y ait toujours annulation de la rhizogenèse. Il apparaît ici que la nervure joue un rôle prépondérant dans la localisation des bourgeons .

2. Prélèvements d'explantats calibrés le long des nervures (Pl. XXXIV, fig. 2 et 3) .

Dans cette expérience, des prélèvements calibrés, découpés à l'emporte-pièce de diamètre 18, 15, 13, 10, 7, 5 mm, et les feuilles ayant servi au découpage sont systématiquement mis en développement et contrôlés. La caulogenèse s'effectue strictement au niveau des blessures proximales. Si la vigueur des néoformations est fonction de la

surface de l'explantat, par contre, la polarité s'est manifestée dans tous les cas.

3. Autres types de découpage du limbe (Pl. XXXIV, fig. 4 à 6 ; pl. XXXV, fig. 1) .

La polarité de morphogenèse a été conforme aux observations précédentes .

4. Toutes les autres espèces expérimentées dans les mêmes conditions ont donné des réponses semblables (Peperomia, Lilium, Streptocarpus, etc.). Les écailles de lis se prêtent à quelques autres types d'investigation. Ainsi on a comparé le nombre de bourgeons sur les fragments basaux, moyens et apicaux d'écailles tronçonnées transversalement (tableau 22) .

On notera :

1. le petit nombre de bourgeons initiés, le plus souvent en position adaxiale ;

2. la plus grande vigueur des bourgeons formés par le fragment basal, se traduisant par un poids moyen plus grand et un nombre de racines adventives plus importants ;

3. si on utilise le critère "nombre de bourgeons par gramme de matière fraîche", les résultats obtenus avec les différents fragments sont sensiblement identiques ;

4. la polarité est respectée sur tous les fragments .

Si les écailles sont tronçonnées longitudinalement, chaque fragment porte en moyenne 1 bourgeon ; il n'y a donc pas de nouvelles initiations par rapport au cas précédent. Ceci indique qu'une zone privilégiée de formation de bourgeons, imprécise comme on l'a vu, pourrait exister au niveau des nervures latérales .

TABLERAU 22 - Intensité du bourgeonnement sur des fragments d'écaillés
de Lilium martagon tronçonnées transversalement .

	Position du tronçon		
	Fragment de base	Fragment moyen	Fragment apical
Nombre de bourgeons /fragment	2, 3	2, 3	1, 7
Nombre de racines /bourgeon	2, 8	1, 3	0, 5
Poids moyen d'un bourgeon en mg.	30, 6	12	4
Nombre de bourgeons par gramme de matière fraîche	7, 7	6, 6	8, 8
Polarité	+	+	+

Si on fragmente l'écaïlle en épaisseur, on note que seule la face supérieure bourgeonne .

En conclusion, la polarité de morphogenèse est stricte dans les explantats foliaires des espèces étudiées. L'observation montre que la nervure joue un rôle essentiel dans la localisation des bourgeons ^{formés} dans des conditions naturelles .

B - Rôle de la nervure dans la polarité .

Les explantats sont prélevés, le long des nervures principales et séparés en 3 lots : partie basale (grosses nervures), partie moyenne (moyennes nervures) et partie apicale (petites nervures). Ils sont comparés aux explantats pris en dehors des nervures, les résultats sont résumés dans le tableau 23 .

Il apparaît que les fragments pris dans la portion distale des nervures ou en dehors des nervures présentent une réduction significative du nombre des bourgeons formés. La comparaison est plus intéressante du point de vue de la polarité. A surface égale, la polarité est perturbée dans les fragments sans nervure principale (50 % des explantats sont sans polarité). Il apparaît donc que la nervure joue un rôle primordial dans la polarisation de la morphogenèse, vraisemblablement par le drainage de l'explantat et l'établissement d'un courant circulatoire privilégié dirigé vers la section proximale entraînant l'inanition de la section distale et stimulant la constitution des bourgeons du côté proximal ; ceux-ci sont générateurs d'appels moléculaires, accentuant le déséquilibre entre les 2 pôles de l'explantat. Si cette hypothèse est bonne, il faudra vérifier :

1. si l'interruption du transit peut troubler la polarité,
2. si l'élimination de la zone de morphogenèse du côté proximal, (suppression des appels moléculaires) peut déterminer la constitution de bourgeons en position distale (rôle de la blessure dans la stimulation) ,

TABLEAU 23 - Rôle des nervures sur l'intensité du bourgeonnement et de la polarité dans le cas d'explantats foliaires de Begonia rex.

	Nature de l'explantat				explantats prélevés en dehors des nervures principales
	explantats avec grosses nervures	explantats avec moyennes nervures	explantats avec petites nervures		
Nombre d'explantats	67	72	72		30
Nombre de bourgeons/expl.	2,7	2,7	2,4		1,5
Intervalle de confiance de la moyenne (bourgeons)	+ - 0,7	+ - 0,5	+ - 0,8		+ - 1,3
Nombre de bourgeons dominants/expl.	1,1	1,2	1,1		0,9
Nombre d'explantats sans polarité de morphogénèse (bourgeons)	0	0	0		16

3. si on peut observer histologiquement dans les premiers jours la reprise d'activité mitotique du côté distal, la formation des bourgeons étant ensuite bloquée par le développement plus rapide (conditions nutritionnelles privilégiées) des points caulinares en position proximale.

Rapportons enfin une dernière expérience : si les nervures principales sont isolées du limbe (tableau 24), on note que la rhizogenèse est totalement abolie, alors que quelques bourgeons se différencient d'une manière polarisée. Il apparaît donc que la capacité de caulogenèse est moins dépendante du limbe que la néoformation des racines. Avec une autre variété, Prévot (1968) observe aussi la capacité de néoformations de bourgeons sur des nervures isolées, mais la polarité de la morphogenèse disparaît .

C - Rôle de l'interruption du transit dans la polarité et rôle de la blessure .

L'expérience a été prévue de façon à séparer l'effet blessure de l'effet conduction (accumulation des métabolites) sur la polarité de morphogenèse. Plusieurs traitements ont été imaginés :

1. suppression partielle de l'épiderme du côté proximal jusqu'à la moitié de l'explantat (extension du phénomène blessure et effet éventuel sur la polarité) ,
2. épiderme soulevé du côté proximal mais fragment fixé par la partie supérieure à l'explantat,
3. interruption des zones de conduction par une lame de verre,
4. épiderme enlevé du côté proximal combiné à une interruption des vaisseaux,
5. même traitement du côté distal,
6. épiderme supprimé du côté distal sans interruption des vaisseaux,

7. épiderme totalement supprimé de la face proximale vers la face distale,
 8-9 : témoins constitués par des explantats séparés en deux moitiés ou
 des explantats entiers .

Les traitements et résultats sont exprimés dans la
 planche XXXVI et le tableau 25 ; on peut faire les observations suivantes :

Dans le traitement 1, on note l'apparition de mamelons méristématiques non fonctionnels le long de la blessure occasionnée par le prélèvement de l'épiderme, mamelons dont la vigueur va en croissant vers la section proximale, au niveau de laquelle les bourgeons produisent des feuilles. (Pl. XXXV, fig. 2). Donc l'effet blessure se manifeste par la réactivation des zones privilégiées d'initiation dans une région où le témoin reste totalement inerte. Toutefois ces mamelons sont arrêtés dans leur organogénèse. Le gradient de vigueur observé peut correspondre à un gradient d'accumulation en liaison avec la conduction. Cette hypothèse est partiellement confirmée par les résultats des traitements 3 et 4, pour lesquels l'interruption du transit de conduction provoque l'apparition de mamelons et de bourgeons fonctionnels en petit nombre, en liaison avec une nouvelle zone d'accumulation. Toutefois, le phénomène est limité, alors que le témoin 8 montre un bourgeonnement égal sur les 2 moitiés d'explantats. Il est vraisemblable que le transit vers la face proximale de l'explantat s'effectue aussi par l'intermédiaire du limbe en contournant le point d'interruption, provoquant une "fuite" à partir de la zone interrompue, comme l'indique les résultats nuls du traitement 6. De la même façon les résultats nuls du traitement 5 sont un argument en faveur de la conjonction du phénomène blessure et du phénomène d'accumulation dans la stimulation des bourgeonnements à la section proximale. Le traitement 7 montre que la stimulation peut se faire malgré tout, avec un gradient croissant de vigueur vers la section proximale, sur toute la longueur de la blessure épidermique ; on peut noter dans ce cas une stimulation de la morphogénèse à la section proximale (si la blessure est impliquée dans la production d'une substance

TABLEAU 24 - Morphogenèse à partir de nervures isolées de Begonia rex

	Nature des nervures		
	grosses nervures	moyennes nervures	petites nervures
Nombre d'explantats	14	16	27
Nombre d'explantats avec racines	0	2	2
Nombre d'explantats avec bourgeons	10	13	16
Nombre de bourgeons par explantat	3,0	2,0	1,4

stimulant la mitose, substance qui diffuse, comme on l'a montré, à partir de la zone lésée, on peut suggérer que l'augmentation de la surface blessée peut amener une augmentation corrélative du nombre de bourgeons; toutefois, cette hypothèse reste à vérifier). Dans tous les cas, aucun bourgeon n'apparaît sur la zone dénudée, ce qui montre à nouveau que la propriété de bourgeonner est bien liée à l'épiderme. L'épiderme, lorsqu'il est soulevé (traitement 2), reste en liaison avec l'explantat par sa partie distale : il ne se maintient pas en vie (même après un traitement par une cytokinine). Dans un seul cas, la moitié distale du fragment épidermique a survécu et des mamelons peu développés se sont formés .

En conclusion, ces observations suggèrent qu'il faut bien envisager dans le phénomène de la polarité de morphogenèse sur un fragment foliaire la conjonction de 2 facteurs principaux : un facteur "blessure", dont l'effet stimulant sur les mitoses se ferait sentir également au niveau des 2 sections, et un facteur "conduction" (hormonal et nutritionnel), de nature polarisée, déterminant une accumulation privilégiée à la section proximale. Signalons que la conduction polarisée dans la feuille détachée a été montrée par Hart en 1964, Nakata en 1967 et Leonard en 1968. Nous avons voulu vérifier l'hypothèse précédente en étudiant histologiquement la région du pôle distal, pour savoir si la blessure ne provoque pas l'initiation de points caulinaires comme à l'autre pôle de l'explantat, et en recherchant si la suppression des néoformations proximales pouvait provoquer un changement dans la polarité de la morphogenèse. Nous vérifierons en même temps si l'aptitude à bourgeonner disparaît au cours de la culture (épuisement possible des facteurs stimulateurs) .

D - Observations histologiques au niveau de la section distale (Pl. XXXVII) .

Ces observations ont pour but de vérifier l'hypothèse suivante : l'effet primaire sur la reprise d'activité mitotique est dû essentiellement à la réaction de blessure et de ce fait est symétrique. Autrement dit, les

TABLEAU 25 - Effets de la suppression de l'épiderme et de l'interruption des vaisseaux sur la morphogenèse (types de traitements décrits dans la figure 1 de la planche XXXVI)

	Types de traitement								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre d'explantats	53	28	12	21	33	23	12	17	11
Nombre de bourgeons au niveau de la section proximale	11,6	10,2	9,4	12,9	10,0	11,4	18,9	10,0	12,2
Nombre d'explantats présentant des bourgeons ou mamelons au point d'interruption des vaisseaux	-	-	7	20	-	3	-	-	-
Nombre de bourgeons au point d'interruption des vaisseaux	-	-	1,8	0,5	-	0	-	-	-
Nombre de bourgeons au point d'interruption de l'épiderme	0	-	-	-	0	0	-	-	-
Nombre d'explantats présentant bourgeons ou mamelons le long de la blessure occasionnée par la suppression de l'épiderme	44	26	-	-	0	0	11	-	-
Nombre total de bourgeons par explantat	11,6	10,2	11,2	13,4	10,0	11,4	18,0	10,0	12,2

zones privilégiées d'initiation entrent aussi en activité du côté distal. Un phénomène secondaire se manifeste, plus tardivement, en liaison avec la polarisation de la conduction, déterminant un enrichissement progressif au niveau de la section proximale et un appauvrissement corrélatif au niveau de la section distale, ayant comme effet d'arrêter l'évolution morphogénétique des points caulinaires à ce pôle de l'explantat. Les résultats sont exprimés dans le tableau 26 .

TABLEAU 26 - Comparaison des réactivités mitotiques à la section proximale et distale après 5 jours et 13 jours de séparation, au niveau des zones privilégiées d'initiation .

	Moment de l'observation	
	5 jours après la séparation	13 jours après la séparation
Nombre de Z. P. I. observées au pôle distal	130	168
Nombre de Z. P. I. en division en % au pôle distal	8,5	8,8
Nombre de Z. P. I. observées au pôle proximal	233	240
Nombre de Z. P. I. en mitose au pôle proximal	13,3	20

Il semble donc que l'hypothèse formulée soit acceptable : les mitoses sont bien initiées aux 2 pôles de l'explantat en réaction à la blessure, au niveau des zones privilégiées d'initiation de bourgeons déjà décrites .

Il faut ajouter que les initiations de bourgeons situées du côté distal, sont après 13 jours, très en retard sur les points de morphogénèse situés du côté proximal ; les premières sont restées pour la plupart à 1 ou 2 divisions par cellule privilégiée tandis que, pour les

secondes, la structuration des futurs méristèmes est nettement amorcée (mise en place de l'assise tunicale) : les ébauches proximales pourraient exercer précocement une inhibition (d'ordre hormonale ou nutritionnelle) sur celles qui sont apparues à la section distale .

E - Influence de la suppression de la zone de morphogenèse proximale sur la polarité .

Il y a, dans cette expérience, deux préoccupations :

- a. Vérifier l'hypothèse que les appels moléculaires dirigés vers la section proximale sont responsables de l'établissement de la polarité de développement. Si on supprime la zone des morphogenèse il est possible que les ébauches bloquées du côté distal puissent alors reprendre leur développement et modifier le sens des courants métaboliques .
- b. Répondre à la question : y-a-t-il au cours de la culture épuisement d'un facteur de morphogenèse ? ou bien, une nouvelle blessure suffit-elle à produire l'activation de nouvelles Z.P.I. ?

Les explantats de 3 centimètres de longueur, pris sur les nervures principales sont cultivés dans les conditions usuelles. La section proximale des explantats est "raffaichie" sur 3 millimètres après 1, 3, 7 et 15 jours de culture, en présence d'un témoin. Les résultats sont exprimés dans le tableau 27 dont la lecture nous indique que :

1. L'aptitude à bourgeonner se conserve dans le temps. Il n'y a pas épuisement du ou des facteur(s) de morphogenèse ; il est vraisemblable que la nouvelle blessure joue un rôle non négligeable dans la nouvelle activation .
2. Après 7 jours, la suppression des points caulinaires proximaux entraîne le développement de bourgeons du côté distal : les zones privilégiées de ce pôle, qui restent inhibées dans le témoin, continuent donc

leur organogenèse dans ces conditions. Toutefois les bourgeons distaux ne prennent pas la préséance et n'empêchent pas la reconstitution des points caulinaires en position proximale. Il n'y a vraisemblablement qu'un détournement partiel à leur profit, et le sens général de la conduction n'est pas modifié, mais la compétition trophique et hormonale joue entre les 2 pôles, comme l'indique la comparaison entre le nombre de bourgeons formés au pôle proximal des explantats avec (13,2 bourgeons) et sans néoformation distale (22,6 bourgeons) lorsque la section proximale est "raffaîchie" 7 jours après la séparation de la plante-mère. Nous pensons que cette expérience confirme le rôle des bourgeons proximaux dans l'inhibition de la morphogenèse en position distale, cette inhibition étant probablement due aux appels moléculaires déterminés par eux. On verra dans le chapitre VII que l'on peut provoquer une véritable excision chimique des formations proximales par la 5-bromodeoxyuridine, analogue de la thymidine, qui, incorporée dans l'ADN, annule l'initiation mitotique ; dans ces conditions la polarité est inversée, les bourgeons se formant du côté distal .

3. Lorsque le "raffaîchissement" est effectué après 15 jours de culture, les explantats ont quelques difficultés à se maintenir en survie par suite d'une période de culture trop longue. Il y a comparativement moins d'explantats dépolarisés, ce qui pourrait être en liaison avec un vieillissement et une différenciation des cellules des zones de bourgeonnement stimulées du côté distal, qui deviennent incapables de reprendre leur activité mitotique après un certain laps de temps .

On voit donc que les capacités de morphogenèse se maintiennent au cours du temps après la séparation ; si les hormones naturelles sont impliquées dans le phénomène, comme on peut le penser, il est par conséquent intéressant de noter que le "stock" présent au moment de la séparation n'est pas épuisé par la première morphogenèse ; il pourrait aussi se reconstituer pendant la culture de l'explantat. Il ne faut pas perdre de vue toutefois que la blessure est un stimulus primaire pouvant expliquer la constance du pouvoir morphogène .

TAB. LEAU 27 - Effet de la suppression au cours du temps de la zone de morphogénèse proximale sur la polarité chez Begonia rex. (explantat de 3 cm) .

	Nature du traitement				
	Témoin	suppression après 1 jour	suppression après 3 jours	suppression après 7 jours	suppression après 15 jours
Nombre d'explantats	31	30	30	26	15
Nombre de racines/explantat	3,3	3,3	3,9	4,0	4,6
Nombre de bourgeons en position proximale/explantat	18,0	18,1	17,7	18,6	15,0
Intervalle de confiance de la moyenne (bourgeons)	+ 1,8 - 1,8	+ 1,6 - 1,6	+ 1,7 - 1,7	+ 4 - 4	+ 2,7 - 2,7
Nombre d'explantats depolarisés	1	0	2	11	3
Nombre de bourgeons en position distale/explantat	£	0	£	3,0	0,6
Nombre de bourgeons dominants en position proximale/explantat	2,0	1,8	1,7	1,8	1,0
Nombre de bourgeons proximaux/explantat sans néoformation distale	-	-	-	22,6	-
Nombre de bourgeons proximaux/explantat avec néoformation distale	-	-	-	13,2	-

L'étude précédente a été reprise pour le Peperomia et le Lilium : le premier se prête bien à l'étude de la concurrence entre les points de morphogenèse à cause de la nervation convergente vers l'ombilic pétioleaire (Pl. XXXVI, fig. 2) : on peut, par exemple, laisser en place les néoformations liées à la nervure principale, en supprimant celles apparues au niveau des autres nervures ; on observera comment la régénération s'effectue au niveau de ces derniers. Les tableaux 28, 29, et 30 donnent les résultats de ces expériences, et leur étude permet de conclure que, comme dans le cas de Begonia rex, il n'y a pas épuisement des capacités de néoformations après l'initiation des points de morphogenèse pour ces 2 espèces . Les traitements appliqués au Peperomia montrent qu'une ébauche en place peut inhiber la néoformation de nouvelles ébauches : il y a alors vraisemblablement concurrence entre les points de morphogenèse pour les métabolites et hormones .

F - Conclusion sur l'étude de la polarité par des moyens physiques.

Il a été tenté, par les expériences précédentes, de séparer quelques facteurs intervenant dans la polarisation de la morphogenèse sur les explantats foliaires de Begonia rex . On peut résumer les conclusions de la façon suivante :

1. La blessure est un élément de réactivation métabolique (Chapitre IV) et mitotique qui induit dans les 5 premiers jours une reprise des divisions au niveau des 2 sections : la polarité ne s'exprime pas au début de la séparation .
2. La nervure doit être considérée comme un élément de polarité de la conduction, qui détermine une accumulation des métabolites du côté proximal et un appauvrissement corrélatif du côté distal. Les zones privilégiées d'initiation sont stimulées du côté pétioleaire dans leur évolution vers une structure de bourgeons et ralenties du côté foliaire après le 5ème jour suivant la séparation des explantats .

TABLEAU 28 - Effet de la suppression au cours du temps des zones de morphogenèse proximale sur les capacités de régénération chez Peperomia griseo-argentea.
(Les racines sont visibles sur le témoin après 10 jours et les bourgeons après 20 jours).

	Traitement après :												témoin
	1 j.	2 j.	4 j.	6 j.	8 j.	10 j.	14 j.	17 j.	20 j.	22 j.	27 j.		
Nombre d'explantats	10	10	10	11	11	9	9	10	10	11	9		12
Nombre de racines/ expl. après le traitement	5,8	6,4	6,7	6,8	6,0	8,2	6,2	6,5	6,5	6,3	7,1		6,4
Nombre de bourgeons/racine	1,1	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	1,0	0,9		0,9

TABLEAU 29 - Effet de la suppression partielle des points de morphogénèse sur la régénération d'explantats foliaires de Peperomia griseo-argentea.
(Les traitements, expliqués dans la figure 2 de la planche XXXVI, sont effectués 21 jours après la séparation, c'est-à-dire après la différenciation des bourgeons sur les bases racinaires).

	Traitement 1		Traitement 2		Traitement 3		Sans traitement	
Nombre d'explantats	26		27		28		27	
Nombre de racines par nervure non traitée et vigueur des racines (+)	1	++++	1	++++	-	-	1	++++
Nombre de racines par nervure traitée et vigueur des racines	0,6	+	0,4	+	1	++++	-	-
Nombre de bourgeons par racine formée après le traitement et vigueur des bourgeons	0,2	+	0,2	+	1,6	++++	-	-
Nombre de bourgeons par racine formée aux points non traités et vigueur des bourgeons	1,4	++++	2,4	++++	-	-	1,5	++++

TABLEAU 30 - Effet de la suppression au cours du temps des zones de morphogénèse proximale sur les capacités de bourgeonnement d'écailles de *Lilium (x)* "Enchantment" après 1 mois de culture .

Nature du traitement	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons/ explantat	Polarité
Sans traitement	16	1,6	+
Suppression après 1 jour	30	2	+
Suppression après 3 jours	20	1,3	+
Suppression après 7 jours	39	1,6	+

3. Le limbe conditionne la vigueur des ébauches, sans intervenir dans la polarité .
4. Les zones proximales stimulées dans leur développement déterminant des appels moléculaires privilégiés, accentuant le déséquilibre entre les 2 sections, en activant le flux de conduction. Cet effet a pour résultat l'inhibition définitive des ébauches situées du côté distal. Si on supprime les zones de morphogenèse proximales après 7 jours (et ainsi tout appel moléculaire vers ce pôle), les bourgeons continuent leur développement du côté distal, sans toutefois inhiber la reconstitution de nouveaux points caulinaires du côté pétiole .

Il apparaît donc que la polarité de régénération dans un explant foliaire de Begonia rex est déterminée par plusieurs facteurs, qui agissent successivement dans le temps .

Connaissant l'importance des hormones végétales (auxines, cytokinines et gibbérellines) et celle de leur équilibre relatif dans l'initiation et l'orientation de la morphogenèse, il était tentant de comparer, à des moments choisis en fonction de l'étude histologique, le niveau hormonal (substances actives sur le test mésocotyle de Nitsch et substances actives sur le test moelle de tabac de Murashige et Skoog) des sections proximales et distales, pour tester l'hypothèse qui a été faite d'une accumulation différentielle entre les 2 sections. Toutefois, il n'est nullement assuré que les hormones soient les seules substances impliquées dans la polarisation de la morphogenèse chez Begonia rex .

III - TENTATIVE DE MISE EN EVIDENCE DU ROLE DES HORMONES ENDOGENES DANS LA POLARITE DE MORPHOGENESE .

La nécessité d'un équilibre relatif défini entre les auxines et l'adénine pour l'orientation de la morphogenèse a été montrée in vitro par

Skoog et Tsui en 1948, sur tiges et cals de tabac. Depuis, de nombreux auteurs ont confirmé cette découverte sur des matériels divers non seulement avec l'adénine comme stimulant du bourgeonnement (Miller et Skoog, 1953 ; Plummer et Leopold, 1957 ; Jacquot, 1951 ; Stichel, 1959 ; Nitsch et collab., 1967...) mais aussi avec les cytokinines, beaucoup plus actives (Toponi, 1963 ; Paulet et Nitsch, 1963 ; Heide, 1965 ; Walter, 1968 ; Doerschug, 1968 ; Pillai et Hildebrandt, 1969) . Il serait indispensable toutefois de montrer que ces substances jouent un rôle véritable "in vivo" soit au cours de la morphogenèse, soit en liaison avec des aptitudes naturelles différentes à la régénération. Après les résultats préliminaires de Warmcke et Warmcke (1950), Vardjan et Nitsch (1961), à propos de la racine d'endive, notent un déséquilibre croissant, dans les premiers jours de la séparation, en faveur des cytokinines du côté apical (zone de bourgeonnement) et en faveur des auxines du côté basal (zone d'enracinement) . Heide (1967) montre sur Begonia (x) cheimantha que les jours courts qui diminuent la capacité d'enracinement et augmentent la capacité de bourgeonner, abaissent le taux des auxines endogènes . Il n'a été fait aucune étude de ce type dans le cas de Begonia rex : cette espèce comporte, en effet, une difficulté expérimentale (que l'on ne retrouve pas dans le cas d'une racine tubérisée) : la quantité de matériel végétal nécessaire à une extraction mesurable de substances hormonales endogènes au niveau des zones proximales et distales risque d'être une limite insurmontable pour cette étude ; ainsi, la détection d'une activité cytokinique dans les feuilles de Begonia (x) cheimantha nécessite environ 50 g de poids frais (Heide et Skoog, 1967) . D'autre part, il est indispensable de trouver une technique d'extraction assez simple, pour réduire les pertes dues à de trop nombreux fractionnements. Nous avons tenté une telle étude en examinant successivement, pour les auxines et les gibbérellines, les substances actives sur le test mésocotyle, et, pour les cytokinines, les substances actives sur le test moelle de tabac et sur le test amarante, mis au point au cours de ce travail. Mais, auparavant, nous avons essayé de mettre

en évidence le rôle d'auxines endogènes par une méthode indirecte, en perturbant leur transport polarisé .

A - Action de l'acide triiodobenzoïque (TIBA) et du naphthyl-phthalamate de sodium (NPNa) sur le bourgeonnement dans le cas de Begonia rex.

Dès 1956, Niedergang-Kamien et Skoog montrent les modifications de polarité du transport de l'auxine par le TIBA pour les cultures de tissus. Selon Zwar et Rijven (1956), cette substance agirait en compétition avec l'AIA pour les sites d'action au niveau d'éventuels transporteurs ; Winter (1967) met en évidence une immobilisation de l'auxine marquée dans le coléoptile d'avoine en présence de TIBA. L'auxine endogène, dont la polarité basipétale de conduction est établie par de nombreux résultats, pourrait jouer un rôle par son accumulation proximale dans l'expression de la polarité de morphogenèse. Le naphthyl-phthalamate de sodium (NPNa) pourrait avoir une action comparable .

Pour réaliser cette étude, nous avons ceinturé des explantats de 4 cm de longueur à 2 cm de la section proximale par de la lanoline dans laquelle ont été incorporé l'une ou l'autre des substances en question de façon à obtenir une concentration finale de 10^{-4} M, 10^{-3} M et 10^{-2} M, en présence d'un témoin lanoline + eau. La morphogenèse a été suivie au cours du temps comme le montre la planche XXXVIII .

En conclusion de cette expérience, on doit noter que :

1. La rhizogenèse est fortement diminuée ou annulée à la section proximale pendant les premières 4 semaines ; les racines apparaissent après 7 semaines, ce qui peut être dû à un apport auxinique par les bourgeons néoformés. Il n'y a pas initiation de racines au point traité . Le TIBA 10^{-2} M est fortement toxique .

2. Les bourgeons se forment sensiblement comme pour le témoin. Ce résultat souligne que l'initiation des bourgeons et celle des racines sont

végétaux chromatographiés), par la mesure de l'allongement du premier entre-nœud (ou mésocotyle) de la plantule d'avoine (Nitsch et Nitsch, 1956, 1962) de nombreux auteurs ont utilisé avec succès ce test biologique (Gandar, 1964 ; Harada, 1962 ; Paulet, 1965 ; Sandmeier, 1968). En se basant sur l'étude histologique de la néoformation des bourgeons, nous avons tenté de comparer les contenus en substances actives sur ce test biologique, substances extraites aux niveaux des sections proximales et distales aux moments suivants :

- a - au moment du prélèvement,
- b - après 1 jour de séparation (réactivation des cellules proches de la blessure, constitution de la zone cicatricielle),
- c - après 3 jours de séparation (réactivation des zones privilégiées d'initiation des bourgeons),
- d - après 7 jours de séparation (activité mitotique très grande dans la zone proximale et constitution des mamelons : arrêt d'activité dans la zone distale, expression de la polarité de morphogénèse),
- e - après 15 jours de séparation (structuration des méristèmes caulinaires, initiation de la rhizogénèse au niveau de la section proximale, "blocage" de la zone distale) .

La technique utilisée est décrite dans le chapitre III. La quantité minimale en poids sec (200 mg) pour obtenir une réponse mesurable a été déterminée par une expérience préliminaire. Le résidu après 3 extractions méthanoliques a été testé et s'est montré suivant les cas inhibiteur ou légèrement stimulant. Deux extractions ont été pratiquées pour chaque stade retenu et simultanément pour les 2 pôles. Elles ont donné des résultats à peu près semblables. Dans la planche XXXIX, les histogrammes sont relatifs à l'une des expériences. La gamme témoin n'a pas été indiquée, le but du travail étant seulement de comparer les deux zones extrêmes de l'explantat au moment choisi et les tests

étant effectués en même temps. L'observation des histogrammes permet de distinguer plusieurs zones d'activité, correspondant sensiblement à ce qui est observé par Harada (1962) dans les apex de rose-trémière ou par Sandmeier (1968) dans le mésocotyle d'avoine. Dans le tableau 31, l'assimilation de ces zones à des substances définies, basées sur les travaux de Stowe et Thimann (1954), Nitsch et Nitsch (1956), Harada (1962) est purement indicative, aucune tentative de caractérisation par des réactifs colorés ou par des substances témoin n'ayant été faites.

La comparaison des 2 extrémités de l'explantat dans les 7 premiers jours n'apportent en fait aucun renseignement clair concernant une répartition différente des substances stimulant la croissance du mésocotyle d'avoine. Il est tout à fait vraisemblable qu'au regard du problème traité, la méthode de prélèvement qui englobe à la fois un fragment nerveux et une portion de limbe n'est pas suffisamment précise pour mettre en évidence, si elles existent, des différences significatives dans la nature ou la concentration des substances hormonales actives sur le test mésocotyle. Toutefois, notons que ce résultat est en accord avec certaines observations précédentes qui montrent que la région proximale et distale réagissent de la même manière dans les premiers 7 jours, la polarité du développement apparaissent plus tardivement. 15 jours après la séparation, des différences sensibles apparaissent pour les substances B, C, E : toutefois, à ce moment, les méristèmes sont en voie de développement accéléré du côté proximal et les substances caractérisées à ce niveau peuvent résulter de l'activité métabolique de ces zones de division et non de l'accumulation de substances due à une circulation polarisée. Notons que Sheldrake et Northcote (1968) montrent avec des feuilles détachées de Phaseolus et Avena que le taux d'auxine croît dans les premiers jours, puis diminue jusqu'à la senescence. Toutefois, il n'y a jamais formation de bourgeons dans ces deux cas.

En résumé, dans les conditions de l'expérience, il n'est pas possible de caractériser l'une ou l'autre des extrémités du fragment par l'augmentation d'une ou de plusieurs substances de croissance actives sur le test

TABLEAU 31 - Rf moyen des zones d'activités décelées par le test mésocotyle à partir d'extraits méthanoliques d'explantats foliaires de Begonia rex .
(les régions proximales et distales ont été séparées dans cette expérience) .

Rf moyen	Notation	Nature possible du composé et indication de la concentration à partir de laquelle on peut déceler une activité * sur le test mésocotyle d'avoine .
0,1	A	Acide indolpyruvique .
0,2	B	Tryptophane (10^{-5} M) .
0,3	C	Acide indolacétique (10^{-8} M) .
0,4	D	Acide indolpropionique ($3 \cdot 10^{-6}$ M) ; acide indolbutyrique (10^{-7} M) .
0,5	E	Gibberellines ($GA_3 : 10^{-10}$ M ; $GA_1 : 10^{-9}$ M) .
0,7	F	Indolacétamide ($3 \cdot 10^{-6}$ M), indolacétonitrile (10^{-8} M), indolacetaldehyde ($3 \cdot 10^{-8}$ M), ester méthylique de l'AIA (10^{-8} M) ; tryptophol (10^{-5} M) ; gibberellines ($GA_4 : 10^{-10}$ M ; $GA_7 : 10^{-10}$ M) .
0,8	G	Ester éthylique de l'AIA ($3 \cdot 10^{-5}$ M) ; gibberelline A_9 (10^{-10} M) .

* Nitsch et Nitsch, 1958, 1960, 1962 ; MacMillan, 1961 .

mésocotyle, pendant les premiers jours suivant la séparation des explantats. Ce résultat peut être conforme à la réalité en ce qui concerne ces substances de croissance, les différences physiologiques entre les 2 pôles pouvant être dûes aux cytokinines. Toutefois, il est connu que ces dernières substances n'ont pas une circulation nettement polarisée et qu'elles se déplacent sans doute sous l'action d'appels moléculaires provoqués par des zones en voie de division active. Leur accumulation différentielle serait dans ces conditions un phénomène secondaire et non l'inducteur de la polarisation.

C - Caractérisation de substances ayant une action de cytokinine.

1. Introduction.

Avec notre principal matériel d'étude, le Begonia rex, une telle étude est difficile pour les raisons suivantes :

a. Dans tous les cas d'isolement à l'état pur (ce qui n'est pas le but poursuivi ici), la quantité de matériel frais nécessaire dépasse 100 kilogs (Koshimizu, 1967 ; Letham, 1966 ; Bui Dang Ha, 1970 ...). Si l'on désire seulement montrer la présence de cytokinines dans un extrait en utilisant les tests biologiques habituels, 100 grammes de matériel frais au moins sont nécessaires pour une telle détermination (par exemple, dans la feuille de Begonia (x) chemantha : Heide, 1969). Il est bien difficile de réunir une telle quantité de poids frais pour une comparaison entre les 2 pôles d'une bouture foliaire .

b. Il est indispensable de trouver une méthode simple d'extraction afin de limiter au maximum les pertes de substances inévitables (et souvent incontrôlables) au cours de fractionnements multiples. Le procédé le plus économique est de pouvoir utiliser des extraits bruts .

c. Enfin, les tests biologiques habituels nécessitent l'incorporation dans le milieu de culture d'une grande quantité d'extraits pour la caractérisation de telles substances. C'est la raison pour laquelle nous avons été amené

à mettre au point un autre test, plus rapide dans sa réponse et demandant une plus faible quantité d'extrait, tel qu'il a été décrit dans le chapitre III ; ce test est basé sur la propriété des cytokinines de stimuler à l'obscurité en présence d'un précurseur, la tyrosine, la synthèse des bétacyanines dans les cotylédons et l'hypocotyle de l'Amaranthus retroflexus .

Nous avons d'abord tenté de réaliser l'extraction de telles substances dans un matériel pouvant présenter moins de difficultés expérimentales, par suite de l'absence de pigments différenciés (chlorophylles et anthocyanes), le bulbe écailleux de Lilium .

2. Extraction de substances ayant l'activité des cytokinines à partir des écailles de Lilium (x) "Enchantment" .

a - La première difficulté qui se présente est le moment du prélèvement pour les organes à étudier. Le bulbe se constitue en effet progressivement et est un reflet du métabolisme du système aérien annuel. Il a donc fallu séparer les bulbes correspondant à diverses phases de la végétation, le cycle de développement étant ralenti pour des raisons expérimentales par culture en ambiance fraîche (6° de nuit, 12° de jour) sur Vermiculite dans les serres à lumière naturelle du Phytotron de Gif-sur-Yvette. Les étapes retenues sont les suivantes :

Stade A et B : Prélèvement à la sortie du frigorifique (2-4°) - la croissance du bourgeon principal est commencée (8 à 11 cm sur 24 bulbes). La rhizogenèse est initiée au niveau du plateau ou sur la partie souterraine de la tige annuelle. La mise à fleur est réalisée ; les étamines sont visibles pour les fleurs inférieures de la grappe ; les tépales sont seulement initiés pour les fleurs supérieures. Les bourgeons de remplacement sont présents. Les bulbes sont constituées d'écailles complètement développées et d'écailles juvéniles n'ayant pas terminé leur croissance .

Stade C : Après 4 semaines de culture, croissance de la tige : 17 cm, rhizogénèse très active. L'ovaire est en voie de formation pour les fleurs inférieures, les étamines se mettent en place pour les fleurs supérieures. Les bourgeons de remplacement restent inertes (2 à 3 mm). Les écailles extérieures du bulbe sont en voie de senescence (et seront éliminées), les écailles intérieures terminent leur croissance et sont très turgescentes .

Stade D : après 6 semaines de culture, croissance très active de la tige : 46 cm en moyenne. Les boutons sont en voie de croissance et complètement formés (1 cm pour les fleurs inférieures et 0,5 cm pour les fleurs supérieures). La naissance des bulbilles caulinaires s'annonce par le gonflement des méristèmes à l'aisselle des feuilles. Les bourgeons de remplacement ont commencé leur développement (reconstitution des nouveaux bulbes) .

Stade E : Après 9 semaines de culture, longueur totale de la tige 54 cm dont 7,5 cm pour l'inflorescence en voie de croissance, 4 verticilles de boutons floraux de longueur moyenne : 3,3 cm, 2 5 cm, 2,4 mm, 1,9 cm en partant de la base de inflorescence. Les bulbilles axillaires des feuilles sont en développement (1 mm). Les bourgeons de remplacement ont évolué (1 cm environ) .

Stade G : Après 12 semaines de culture, pleine floraison. Bulbilles développés, bourgeons de remplacement ne montrant aucune modification par rapport au stade précédent .

Stade H : Après 18 semaines de culture, début de fructification et chute des pièces florales. Les bulbilles caulinaires (2-3 mm) sont formés de plusieurs écailles et quelquefois d'une feuille verte et se détachent librement de la tige aérienne. Les bulbes sont très turgescents et constitués par des écailles initiées l'année précédente et ayant terminé leur croissance au cours du cycle actuel. Les bourgeons de remplacement,

qui assureront la végétation de l'année suivante, ont produit des écailles juvéniles .

Stade I : après 28 semaines de culture ; fin du cycle de végétation .

Déssèchement complet de l'axe végétatif. La rhizogenèse se manifeste toujours. Les bourgeons de remplacement se sont développés et donnent des bulbes réduits (2 cm environ de diamètre). Le prélèvement porte sur des jeunes bulbes et sur les écailles non sénescentes du bulbe actuel.

Pour chaque stade retenu, 12 bulbes sont prélevés. Les écailles saines sont lavées à l'eau glacée, puis fixées immédiatement dans l'azote liquide, lyophilisées pendant 48 heures et conservées sous vide à l'obscurité en dessicateur, en présence de Cl_2Ca et d' "Actigel" .

b. Protocole de l'extraction et discussion .

Le problème de l'extraction des cytokinines n'est pas simple : ces substances (adénines substituée en position 6) peuvent se trouver soit à l'état de bases libres, soit sous forme de ribosides ou ribotides, soit fixées dans les t-ARN (bases rares). L'extraction peut être basée sur la propriété du noyau imidazol de former un complexe insoluble avec certains métaux lourds (Hg^{++} , Pb^{+++} , Ag^+) (Kerr et collab., 1949). Toutefois, le pH de l'extrait joue un rôle dans la nature des substances complexées : Kerr et Seraidarian (1945) montrent que les purines libres sont seules précipitables par l'argent à pH acide (2-2,8), ou précipitent avec les nucléosides à pH neutre ou faiblement alcalin. Par contre les nucléotides restent en solution . Les adénines substituées présentes dans les ARN ne sont évidemment précipitables qu'après extraction et hydrolyse de ceux-ci. D'autre part, les composés phosphorés, c'est-à-dire les nucléotides, précipitent à pH neutre ou alcalin par l'acétate de baryum. Les composés ainsi complexés peuvent être ensuite déplacés par le chlorure de sodium ou l'acide chlorhydrique. Ainsi solubilisés, ils peuvent être retenus par le charbon actif (Nitsch, 1960 ; Nitsch et Nitsch, 1965 ; Koshimizu, 1967), l'élution s'effectuant ensuite

par le méthanol ou la diéthylamine. Tout efois cette méthode n'a pas permis à Paulet (1965) de mettre en évidence de telles substances dans des fragments de tige de tabac. La purification peut se faire aussi soit par partage entre des liquides non miscibles (eau-acétate d'éthyle par exemple), soit par chromatographie sur cellulose (eau 100 %, butanol-eau en différentes proportions, butanol secondaire à 5 %), soit sur colonne (Dowex 50 H⁺). Enfin, pour l'extraction, Bui Dang Ha (1970) montre que le méthanol absolu ou aqueux est un bon solvant de ces substances et que le pH n'a pas d'influence entre 2,8 et 7,3 dans le cas d'extraits de topinambour. L'eau bouillante a été utilisée avec succès par Nitsch (1960) .

Un fait important reste à souligner : aucune méthode "universelle" d'extraction ne peut être conseillée et on doit adapter les techniques à chaque matériel végétal. Ainsi, avec les écailles de lis, toute extraction à l'eau bouillante ou au méthanol aqueux est exclue, à cause d'une très grande richesse en substances mucilagineuses, substances dont il est difficile de se débarrasser par la suite. C'est donc le méthanol absolu qui a été choisi. Parmi les stades végétatifs retenus, il était logique de penser que les bulbes du stade H étaient les plus riches, car ils avaient profité, à la fin du cycle végétatif, d'une redistribution des substances élaborées par la partie aérienne, avant l'entrée en sénescence de celle-ci. Ce sont donc les échantillons prélevés à ce stade qui ont été utilisés pour déterminer une méthode d'extraction et connaître la quantité de matériel nécessaire à une caractérisation de ces substances. En fonction des travaux déjà cités, le processus d'extraction a été le suivant :

1. 50 grammes de poids sec (soit 150 grammes de poids frais) ont été broyés 4 fois à la chambre froide, pendant 20 minutes dans 200 ml de méthanol absolu redistillé et glacé .

2. Après filtration, l'extrait (pH environ à la neutralité) a été traité par du AgNO_3N (6 ml) pendant une nuit à 4° C. Il a été vérifié que le nitrate d'argent était en excès .
3. Le précipité d'argent a été isolé par décantation et centrifugation .
4. Après lavage à l'eau, le précipité d'argent a été traité par HCl 0,2 N en quantité suffisante (3 fois 10 ml) pour déplacer les "cytokinines" du complexe argentique. Il a été vérifié qu'aucune précipitation n'avait lieu dans le surnageant total (contenant théoriquement les bases et les ribosides), ce qui indiquerait que celui-ci était complètement débarrassé des ions Ag^+ toxiques .
5. L'extrait acide (pH 2,5 à 3) a été ajusté à un volume adéquat (50 ml en général, soit l'équivalent de 1 gramme en poids sec par ml) par évaporation sous vide à 25° C, puis ramené à un pH de 5,5 par la soude, avant d'être incorporé au milieu. Cet extrait, appelé "extrait argent brut" (EAB) devrait contenir (en plus d'autres substances) les bases puriques libres et les nucléosides de ces bases. Les nucléotides n'ont pas été extraits en principe .
6. Le filtrat méthanolique issu de la précipitation à l'argent (FMA), devrait contenir les substances non précipitables, dont les nucléotides. L'excès de NO_3Ag a été éliminé par HCl N, et le précipité de AgCl_2 retenu sur filtre. Après évaporation sous vide du filtrat, le résidu a été repris par l'eau distillée (50 ml) et le pH ajusté à 5,5 .
7. L'élimination de certains inhibiteurs, comme l'acide abscisique et les acides phénoliques a été effectuée par une séparation par l'acétate d'éthyle sur les extraits ou les filtrats avant l'ajustement du pH à 5,5 ; ces 2 fractions étaient acides, ce qui est une condition de l'élimination des inhibiteurs. La fraction aqueuse contiendrait en particulier les nucléotides .

8. Les diverses fractions ont été testées, en quantité convenable, par le test moelle de tabac modifié de Jablonsky et Skoog (1954) ou par le test anthocyane d'amarante tel qu'il a été défini ci-dessus .

C - Résultats .

1. Comparaison des divers stades retenus .

- Une étude préliminaire (Pl. XXXXI, fig. 1), a montré que l'extrait obtenu à partir d'une quantité de 40 grammes de poids sec par litre de milieu de culture était ~~con~~venable pour déterminer une action mesurable sur la reprise d'activité mitotique de fragments de moelle de tabac. Une quantité supérieure devient inhibitrice, ce qui laisse supposer la présence de substances antagonistes dans l'extrait, substances dont l'action devient prépondérante. Le test amarante a donné des résultats comparables. L'activité des substances extraites de cette quantité de matériel végétal a une action sensiblement équivalente à celle d'une solution contenant $10\text{ }\mu\text{g/l}$ de kinétine. On notera que le test amarante est moins sensible aux inhibiteurs, ce qui constitue un point intéressant pour la mise en évidence des cytokinines en présence de ces composés (Pl. XXXXI, fig. 2) .

- Dans une 2ème expérience, les divers stades ont été comparés entre eux pour les quantités de 20, 40, 60 grammes, en poids sec d'écaillés, par litre d'extrait. Les résultats de cet essai sont consignés dans le tableau 32 en fonction du témoin sans kinétine, rapporté à 100 . D'autre part, (figure 3 de la planche XXXX) on a comparé l'évolution du taux de substances stimulant la division cellulaire au degré de bourgeonnement des écaillés prélevées aux divers stades .

On notera en conclusion de ces essais que :

- La méthode d'extraction utilisée permet de caractériser chez le lis des composés qui ont une action analogue à celle des cytokinines. Toutefois, la quantité de matériel frais nécessaire à une telle caractérisation est

TABLEAU 32 - Comparaison des activités "cytokinines" d'extraits d'écaïlles de *Lis*, effectués au cours du développement (Test moelle de tabac ; poids frais et poids sec pour 10 explantats en % du témoin) .

Nature de Stades l'essai	Témoin	10 µg/l kinétine	100 µg/l kinétine	20g en poids sec d'écaïlles	40g en poids sec d'écaïlles	60g en poids sec d'écaïlles
B	100	166 100	207 215	109 116	76 95	47 71
C	100	352 100	423 373	84 102	80 91	60 61
D	100	200 100	258 255	82 87	89 96	81 96
E	100	325 100	498 411	148 133	138 124	195 142
G	100	130 100	311 275	141 128	131 124	167 152
H	100	170 100	243 231	-	191 204	-
I	100	211 100	350 365	146 156	142 166	153 154

d'environ 100 grammes, ce qui rend difficile la comparaison des deux pôles au cours de la morphogenèse .

- Il existe une phase dans le cycle de développement du bulbe de Lis "Enchantment" pour laquelle la mise en évidence de substances à action de cytokinine (test moelle de tabac) est plus facile : il s'agit du stade H, et à un moindre degré, du stade I, correspondant au moment de la reconstitution du bulbe et de la sénescence de l'appareil végétatif. Par contre, à la sortie de la période de dormance, ces composés ne sont pas détectables : il est possible qu'ils aient été mobilisés pour la mise en place du bourgeon de remplacement ou qu'ils aient migrés vers celui-ci au début du développement . On pourrait objecter que les résultats de cette expérience mesurent les variations relatives du taux de substances stimulantes et inhibantes au cours du temps , substances extractibles par une précipitation au nitrate d'argent. Pour répondre à cette objection, il a été fait un témoin "extrait argent brut + kinétine à la concentration de 100 µg/l" pour les stades E et G. Ces combinaisons ont produit une stimulation identique ou légèrement supérieure au témoin kinétine seule, à la concentration de 100 µg/l ; ceci laisse présumer que, pour la quantité de matériel extrait, les substances inhibitrices ont une action négligeable (tableau 33) .

TABLEAU 33 - Effet de la kinétine (100 µg/l) en présence d'un extrait d'écailles de lis (40 g de poids sec) sur la stimulation de la moelle de tabac (en % du témoin pour 10 explantats : poids frais en haut à gauche et poids sec en bas à droite).

Stades	Nature de l'essai			
	40 g/l en poids sec d'écailles extraites	id° + 100 µg/l de kinétine	100 µg/l de kinétine	Témoin
Stade E	138 124	448 358	498 411	100 100
Stade G	131 124	442 353	311 275	100 100

Il ressort donc de cette étude que le moment où le matériel végétal est prélevé à une grande importance car la teneur en "cytokinines" peut varier beaucoup avec le stade de développement .

- Enfin on trouve une bonne corrélation entre le niveau endogène de ces substances et "le degré" de bourgeonnement des écailles isolées, fait qui paraît intéressant à souligner. Il existe, en effet peu de résultats mettant en évidence une corrélation entre aptitude à bourgeonner et richesse en cytokinines endogènes à part l'endive (Vardjan et Nitsch, 1961) et le Begonia (x) cheimantha (Heide et Skoog, 1967) .

2. Comme il a été souligné plus haut, à pH acide ou neutre, les nucléotides ne sont pas précipitables par le nitrate d'argent. Nous avons recherché la présence soit de ceux-ci, soit d'autres substances stimulantes dans le filtrat issu de la précipitation. Pour tous les stades retenus, le filtrat brut débarrassé de l'excès de nitrate d'argent s'est toujours révélé très toxique, et l'addition de kinétine montre la présence de puissants inhibiteurs de la reprise d'activité mitotique de la moelle de tabac. L'étude a porté sur le filtrat issu du stade H, le plus riche en substances stimulantes ; comme l'indique la figure 3 de la planche XXXXI, sur laquelle on a placé en regard l'extrait argent brut et les fractions du filtrat obtenues par une séparation simple à l'acétate d'éthyle, on peut déceler une activité non négligeable de la fraction aqueuse sur le test moelle de tabac. Le test amarante, moins sensible aux inhibiteurs comme il a été vu plus haut, indique une activité encore plus grande (Pl. XXXXI, fig. 3 et pl. XXXXII, fig. 2). On voit donc que la précipitation au NO_3Ag n'est pas suffisante pour "isoler" toute l'activité cytokinique d'un extrait, une certaine fraction de celle-ci reste dans le filtrat (phase aqueuse). Ceci nécessite donc une étude plus complète pour déterminer la catégorie des substances à action de cytokinines précipitable et non précipitable par l'argent. Cette étude n'a pas été entreprise ici, car hors du sujet de travail. Signalons seulement que la chromatographie de l'extrait à l'argent dans un mélange butanol secondaire (84 %) - eau

(16 %) nous a livré une fraction active dans la bande comprise entre les Rf 0,1 et 0,2, correspondant à des substances polaires (Pl. XXXXI, fig. 3 et pl. XXXXII, fig. 3). Gupta et Maheshwari (1970) obtiennent avec le même mélange chromatographique dans une même zone une activité de type cytokinine à partir d'extrait de graines de courge .

3'. En conclusion, il paraît peu facile de caractériser les substances à action de cytokinines d'une manière comparative au cours de la morphogenèse au niveau du pôle proximal et distal à partir des écailles isolées de lis à cause :

1. de la quantité de matériel nécessaire à leur mise en évidence,
2. du manque de sûreté d'une méthode d'extraction relativement simple, faisant intervenir une précipitation au NO_3Ag .

Toutefois, nous avons persévéré à propos du matériel qui nous préoccupe le plus, Begonia rex .

3. Extraction des substances ayant une activité de cytokinines à partir des feuilles de Begonia rex .

a. Dans une première expérience, la méthode au méthanol glacé (à 80 % a été utilisée sur du matériel lyophilisé comme dans le cas du lis. On retient alors dans l'extrait :

- les chlorophylles,
- les anthocyanes, très abondants dans la feuille de cette espèce,
- les acides organiques, en particulier l'acide oxalique, qui abaissent le pH à 2,5. L'extrait est très tamponné. L'acide oxalique se combine à l'argent et précipité sous forme d'oxalate d'argent en même temps que les substances recherchées. Lors du traitement par HCl 0,2 N, cet acide est déplacé et maintient le pH à 2,5 dans l'extrait argentique brut ; à cette acidité, une certaine quantité de ClAg reste en solution ; il devra être éliminé à cause de sa toxicité, par une alcalinisation à la soude (pté noir de AgOH) .

Le résidu obtenu après extraction au méthanol glacé a été traité par le méthanol bouillant et l'extrait a été étudié de la même façon. Les filtrats ont été testés. On a réalisé le test moelle de tabac et le test amarante. Les résultats de cette expérience sont les suivants :

- Le précipité à l'argent issu de l'extrait au méthanol glacé^{*} est inhibiteur comme le montre le témoin extrait + cytokinine 100 ug/l, pour lequel il se forme des cals polarisés de très faible volume. Toutefois les fragments de moelle montrent quelques points verts correspondant à une multiplication cellulaire qui laissent présager la présence de substances stimulantes.
- Le précipité à l'argent issu de l'extrait au méthanol bouillant^{**} n'est pas toxique. Il se développe des cals de type auxinique avec quelques points verts .
- Le mélange des 2 fractions précédentes n'a pas une action supérieure sur le développement de la moelle de tabac .
- Le filtrat issu de ^{*}) est inhibiteur .
- Le filtrat issu de ^{**}) provoque l'apparition sur tous les fragments de moelle de tabac de zones de divisions cellulaires très chlorophylliennes analogues à ce qu'on observe avec la kinétine ; il reste néanmoins inhibiteur .

Cette méthode simple ne nous permet en aucun cas de mettre nettement en évidence une activité cytokinine par le test moelle de tabac à partir d'un extrait de feuilles lyophilisées (75 et 125 g de poids frais par litre). Le test amarante est, lui aussi, totalement négatif .

b. En fonction des résultats précédents, la méthode a été modifiée comme suit :

- le méthanol aqueux 80 % a été remplacé par du méthanol pur redistillé

de façon à diminuer la quantité d'acides organiques et d'anthocyanes passant dans l'extrait. Toutefois, le pH est resté à 2,5 après l'extraction, ce qui montre que la petite quantité d'eau contenue dans le méthanol pur est suffisante pour extraire les acides organiques .

- L'extrait après évaporation sous vide a été traité par l'acétate d'éthyle (élimination possible des inhibiteurs et des chlorophylles). Toutefois, on peut trouver des cytokinines dans la fraction acétate d'éthyle, comme l'a montré Nitsch en 1966 sur jus de tomate. Elle sera donc débarrassée des chlorophylles par l'hexane, puis traitée ensuite comme la fraction aqueuse .

- La fraction aqueuse issue de la séparation précédente a été fractionnée par le butanol secondaire (Nitsch et Nitsch, 1966) .

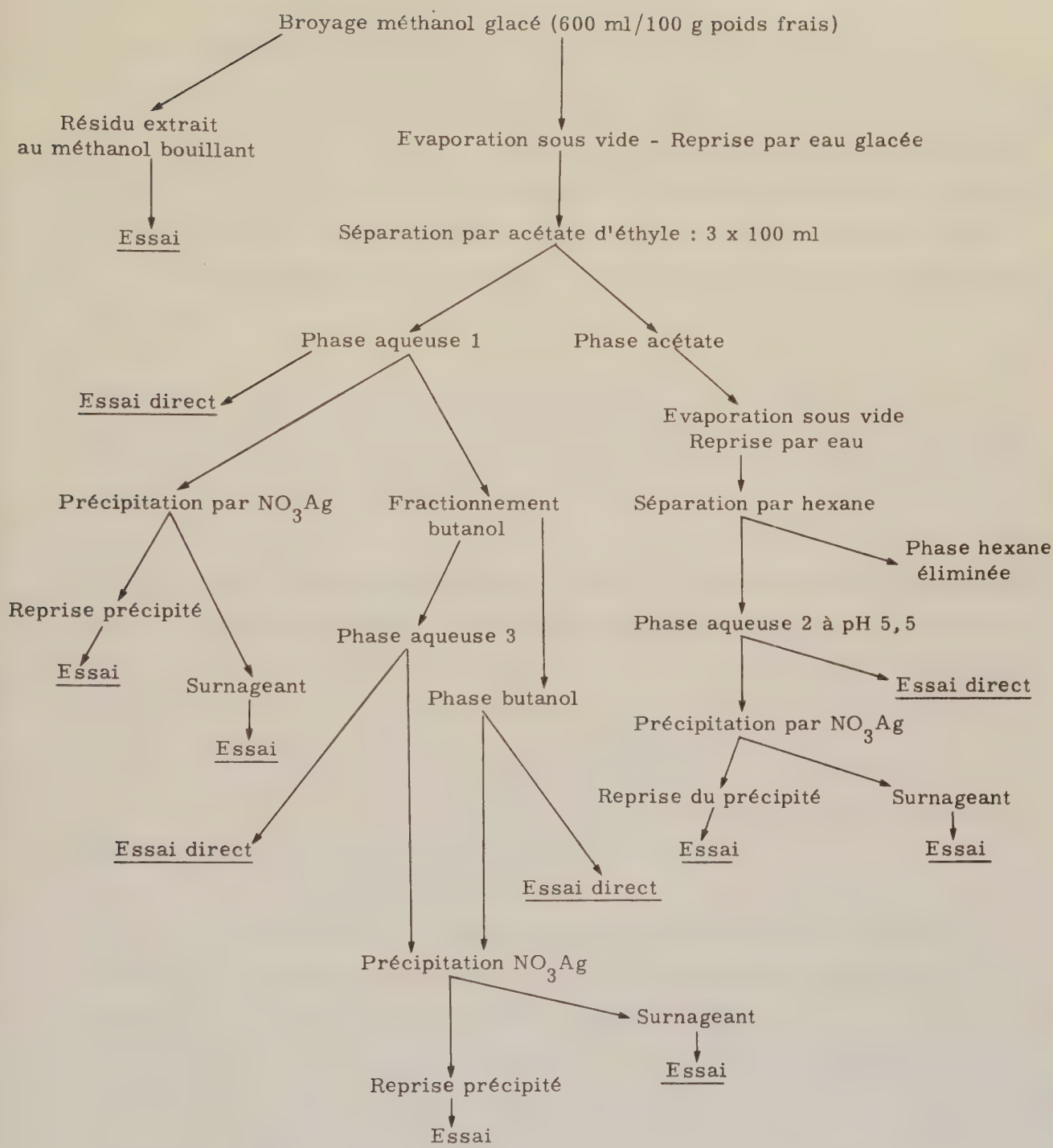
Le procédé de l'extraction est schématisé à la page 152 .

Les tests biologiques ne permettent aucune caractérisation de substances à action de cytokinines dans une des fractions étudiées. En présence de kinétine à la concentration de 100 ug/l, tous les extraits sont inhibiteurs .

c. Sur le même schéma, il a été tenté de remplacer le méthanol par l'eau bouillante (Nitsch, 1955, 1960, 1961) ; les chlorophylles restent alors dans le résidu. Ici encore, aucune activité de type cytokinine n'a pu être décelée dans les diverses fractions, qui sont toujours inhibitrices en présence d'une solution de kinétine à 100 ug/l .

d. En dernier lieu, il a été tenté de modifier la méthode de la façon suivante :

1. Le méthanol glacé a été remplacé par du méthanol 80 % bouillant pour réaliser l'extraction. En effet, nous avons souligné que l'extrait du résidu par ce dernier (après le traitement par le méthanol à 4° C) se montrait légèrement actif. L'inconvénient majeur est que la quantité de chlorophylles est bien supérieure au processus réalisé à froid. Toutefois, un passage au



froid de l'extrait entraîne la précipitation partielle de ces composés .

2. Pour réaliser une purification partielle de l'extrait et éliminer les acides organiques, une résine échangeuse d'ions (Dowex x 4, 50-100 mesh) a été utilisée sous forme H^+ . Une partie des anthocyanes a été retenue. L'élution s'est faite par l'ammoniaque 5 N. Rappelons que Heide et Skoog (1967) notent qu'aucune activité cytokinine ne peut être décelée à partir de feuilles de Begonia (x) cheimantha si le passage de l'extrait sur colonne est omis .

3. Les substances actives fixées sur la colonne sont éluées par l'ammoniaque 5 N ; l'effluent ammoniacal, évaporé sous vide, sera traité sensiblement comme précédemment .

4. Pour éviter une évaporation sous vide de l'extrait méthanolique aqueux après passage sur colonne, évaporation rendue difficile par la présence de chlorophylle, le charbon actif (Nitsch et Nitsch, 1960, 1965) a été utilisé pour retenir éventuellement des substances actives non fixées sur la colonne. Le charbon actif a été élué ensuite par le mélange pyridine (100, eau (50, alcool (45), NH_4OH (5). Après évaporation sous vide, l'éluat repris par l'eau a été traité par le NO_3Ag .

Finalement, le processus appliqué est schématisé à la page 154 : les lettres avec indice indiquant la distribution des fractions essayées sur le test moelle de tabac, fractions dont on verra la désignation dans la légende de la planche XXXXIII. La méthode est indiquée pour 100 g/ poids frais de feuilles. Il est indispensable d'ajouter certaines observations réunies dans le tableau 34 si on ne veut pas commettre d'erreur sur l'interprétation des histogrammes de la planche XXXXIII .

L'étude des résultats (Pl. XXXXIII et XXXXIV) liée aux observations réunies dans le tableau 34 permet de donner les conclusions suivantes pour cette expérience .

Broyage dans le méthanol bouillant 80 % à 80°
(3 fois avec 300 ml pour 100 g/poids frais)

Froid à 4° et filtration
(élimination partielle des chlorophylles)

Passage sur Dowex X_4H^+

Effluent méthanolique

Lavage Dowex par méthanol aqueux

Essai d'une fraction
après évaporation
sous vide E

Elution par NH_4OH 5N (500 ml)
(anthocyanique)

Evaporation sous vide et reprise
du résidu par eau (100 ml)

Précipitation par NO_3Ag

Séparation par le
butanol secondaire

Traitement charbon
à 4° pendant 12 heures
(2 grammes)

Elution par pyridine
eau, alcool, NH_4OH
(200 ml)

Reprise du précipité
par HCl 0,2 N
(anthocyanique)

Phase aqueuse
(anthocyanique)

Phase butanolique

Evaporation sous vide

Reprise par eau

Essai
 N_1, N_2, N_3, N_4, N_5

Essai
 A_1, A_2, A_3, A_4, A_5

Essai C

Filtrat

Essai
 F_1, F_2, F_3, F_4

Essai
 A_5, B_1, B_2, B_3, B_4

Précipitation par
 NO_3Ag

Reprise du précipité
par HCl 0,2 N

Filtrat

Essai CN, CNK

Essai FCN

TABLEAU 34 - Types de cals obtenus à partir de la moelle de tabac pour les diverses fractions testées d'un extrait méthanolique de feuilles de Begonia rex.
(se reporter au protocole d'extraction à la page 154)
la kinétine est donnée à la concentration de 100 ug/l

Fractions testées	Type de cals obtenus
A ₁ , A ₂ , A ₃	Cals de type auxinique
* A ₄ (A ₃ + kinétine)	Promotion très importante de cals de type cytokinine, d'un poids 2 fois supérieure à celui du témoin kinétine 100 ug/l
A ₅	Cals de type auxinique
B ₁	Cals de type auxinique
B ₂	Cals auxiniques avec quelques points verts
* B ₃	Cals mixtes, présentant à la fois des caractères auxiniques et des nodules denses de type cytokinine.
B ₄ (B ₃ + kinétine)	Cals de type cytokinine, tout à fait comparable au témoin kinétine. La fraction n'est pas inhibitrice.
N ₁	Cals de type auxinique avec quelques points verts de développement.
N ₂	Idem avec accentuation du caractère de développement analogue à celui caractérisant les cytokinines.
* N ₃	Cals de type cytokinine dont la conformation est semblable à celle du témoin kinétine 10 ug/l (peut-être moins compact).
N ₄ (N ₃ + kinétine)	Cal de type cytokinine, mais inhibition de développement par rapport au témoin kinétine seule.
N ₅	Cals analogues à ceux de N ₃ moins développés.
F ₁ , F ₂ , F ₃	Cals de type auxinique.
F ₄ (F ₃ + kinétine)	Cals de type cytokinine, nettement inhibés par rapport au témoin.
E, EK, C	Pas de cal, inhibition complète.
CN	Cals réduits de type cytokinine.
CNK (CN + kinétine)	Cals de type cytokinine 2 fois moins développés que le témoin kinétine seule. Il y a donc inhibition.
FCN	Inhibition, avec quelques points verts.

* Fraction remarquable.

1. La fraction aqueuse de l'éluat ammoniacal (A_1 , A_2 , A_3) est inactive, mais en présence de kinétine à la concentration de 100 $\mu\text{g/l}$ (A_4) permet une promotion très importante de la multiplication cellulaire par rapport au témoin kinétine seule. Il y a donc là un effet de synergie intéressant : on pourrait suggérer qu'il s'agit de l'adénine, qui seule à une action faible sur le test moelle de tabac, mais dont l'activité synergique avec les cytokinines a été montrée (Loewenberg, 1969), en particulier dans la néoformation de bourgeons (Nitsch et collab., 1967) .

2. La fraction butanolique (B_3) de l'éluat ammoniacal contient un facteur de division. Cette fraction, sans anthocyane, n'est pas inhibitrice en présence de kinétine (100 $\mu\text{g/l}$ (B_4) .

3. Les 2 fractions précédentes combinées ne présentent aucune synergie (A_5) .

4. La précipitation au NO_3Ag de l'éluat ammoniacal (N_3) permet de caractériser un facteur de division, dont l'activité correspond approximativement à une solution de kinétine de concentration 10 $\mu\text{g/l}$; un inhibiteur est présent dans la même fraction comme le montre la combinaison avec la kinétine (N_4) .

5. L'effluent méthanolique contient encore des substances stimulantes qu'on peut précipiter par le NO_3Ag (CN). Toutefois, parmi les substances précipitées un facteur inhibiteur est présent comme l'indique la fraction CNK .

En conclusion, il est possible de caractériser un ou des facteurs de division cellulaire à partir des feuilles de *Begonia rex*. Toutefois, la méthode d'extraction complexe, dont la variabilité dans les résultats est soulignée par Heide et Skoog (1967), et la quantité de matériel frais nécessaire rendent très difficile, sinon impossible, l'étude comparative

des deux pôles d'un fragment foliaire pendant la morphogenèse des bourgeons ; d'autre part, comme le font remarquer Thorpe et Murashige (1968) il est vraisemblable que l'effet de dilution, au moment de l'extraction, est trop important pour que l'on puisse déceler des différences significatives dans les substances extraites . Dans le cas du Begonia rex, il ne semble donc pas possible d'aborder le problème de la polarité par l'analyse comparative du bilan des cytokinines au niveau des sections proximales et distales .

IV - CONCLUSION SUR LA POLARITE DE MORPHOGENESE D'EXPLANTATS FOLIAIRES DE BEGONIA REX .

L'étude entreprise par les moyens physiques (traumatismes) incite à penser que la polarité de morphogenèse sur des explantats foliaires de Begonia rex est un phénomène secondaire. En effet, après la séparation, la première réaction est une réponse non polarisée, en liaison avec la blessure : celle-ci induit la reprise d'activité mitotique des cellules épidermiques adjacentes à la cellule basale des poils glanduleux, tant au pôle proximal qu'au pôle distal ; la nervure introduit un élément de polarité de conduction, dont l'effet vraisemblablement, est d'appauvrir la partie distale en métabolites et hormones, au profit de la partie proximale. Les zones d'initiation situées à ce pôle sont stimulées dans leur division et déterminent rapidement des appels moléculaires accentuant le déséquilibre entre les deux extrémités de l'explantat ; le développement des bourgeons initiés au pôle distal est alors arrêté ; il s'agit donc d'une inhibition par corrélation, qui est bien montrée par l'expérience suivante : si l'on supprime, après 7 jours de culture, les initiums de bourgeons situés du côté pétiole, les bourgeons se différencient alors à l'autre pôle de l'explantat . Toutefois, nous n'avons pu déterminer si l'inhibition est due à une carence hormonale : en effet, il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences notables entre les deux pôles d'un explantat, au cours des premiers 15 jours suivant la séparation, dans le contenu en substances

actives sur le test mésocotyle. Remarquons que l'acide triiodobenzoïque et le naphthyl-phtalamate de sodium, connus pour inhiber la polarité de la conduction de l'auxine, ne modifient pas l'aptitude au bourgeonnement, tout en empêchant la rhizogenèse. Il se pourrait donc que les substances ayant l'activité des auxines ne jouent pas un rôle fondamental dans l'induction au bourgeonnement chez Begonia rex .

Quant aux substances ayant l'activité des cytokinines, nous n'avons pas trouvé une méthode simple et répétable permettant une extraction sans contestation, à partir d'une quantité de matériel compatible avec les possibilités de culture. Cet échec nous a incité à rechercher en dernier ressort si l'application exogène de substances ayant une action sur la reprise d'activité mitotique ou sur l'orientation de la morphogenèse était susceptible de fournir des indications vis-à-vis du phénomène de la polarité. Ces résultats seront exposés dans la dernière partie de cette étude .

CHAPITRE VII

EFFETS DE L'APPLICATION EXOGENE DE QUELQUES FACTEURS
CHIMIQUES SUR L'APTITUDE A BOURGEONNER .

I - INTRODUCTION

Les résultats exposés dans les chapitres précédents ont bien montré l'importance de l'épiderme et plus particulièrement celle de certaines cellules, dans l'expression génétique de l'aptitude à bourgeonner pour l'espèce Begonia rex . Certains faits (par exemple, la position des noyaux des cellules initiant les points caulinaires) nous ont incité à faire l'hypothèse d'un message spécifique émis par la cellule basale des poils glanduleux et reçu par les cellules qui lui sont contiguës. La production de ce message est elle-même subordonnée à la rupture des contacts avec la plante-mère. Toutefois, on ignore si l'émission d'un tel message est sous la dépendance d'un signal nouveau ou si, au contraire, on doit faire intervenir la disparition d'un facteur "répresseur" issu de la plante-mère. Cependant, il faut noter qu'un grand nombre de zones privilégiées d'initiation restent inertes après la séparation. Leur activation s'amorcent seulement aux deux pôles de l'explantat, ce qui indique que la zone de cicatrisation joue vraisemblablement un rôle important. On peut tenter d'altérer ou de stimuler le message morphogénétique, ou encore de localiser le moment de son apparition, par l'application immédiate ou différée de substances connues pour leur action sur la morphogenèse. La confrontation de tels traitements avec les observations histologiques doit pouvoir éclaircir certains aspects, vérifier ou infirmer certaines hypothèses concernant la morphogenèse chez le Begonia rex. Les

substances envisagées, dont le nombre a été forcément limité par la durée des expériences, appartiennent soit à la catégorie des hormones végétales (cytokinines, auxines, gibbérellines, morphactines, acide abscissique), soit à celle des précurseurs adényliques ou pyrimidiques des acides nucléiques, soit enfin au groupe des inhibiteurs du métabolisme, y compris certains analogues de bases puriques .

La méthodologie de l'application de ces substances est extrêmement importante à prendre en considération et il est nécessaire de se reporter au tableau 21 résumant nos observations précédentes : il apparaît que trois jours au moins sont nécessaires pour la préparation de la phase de synthèse de l'ADN dans les cellules épidermiques adjacentes à la cellule basale du poil glanduleux. Pendant ce laps de temps, il se développe donc à ce niveau un ensemble de réactions qui doit conduire à la première mitose au cours du 4ème ou du 5ème jour et qui constitue l'information mitotique. Il ne fait aucun doute que l'orientation et la répartition des divisions à partir du 5ème jour est caractéristique de l'établissement d'un méristème caulinaire : il s'agit alors de l'information organogène, qui peut s'établir soit au moment où la première mitose est initiée, soit un peu après. Il y a donc une possibilité d'agir dans le temps sur ces deux types d'information, par un traitement bref, susceptible de les annuler ou de les modifier. C'est ce que nous avons tenté de réaliser par des applications limitées à 24 heures et effectuées soit immédiatement après le prélèvement, soit 1, 2, 3 ou 4 jours après. Ce type d'expérience permet de situer dans le temps avec précision un événement irréversible, l'application constante du facteur envisagé ne donnant aucun renseignement comparable. Cette méthode n'est envisageable que si les séquences du développement sont parfaitement connues et nous soulignons ici l'intérêt d'une étude histologique précise. Le mode d'application de la substance est à considérer : selon la structure de la molécule, son encombrement stérique, sa polarité, etc..., la pénétration ou la circulation s'effectue d'une façon plus ou moins satisfaisante ; nous avons donc choisi de réaliser les traitements par flottaison sur des solutions aqueuses stériles,

opération qui pour un traitement bref, semblait préférable à l'application d'une goutte ou à la pulvérisation d'une solution sur le limbe. Après le traitement, les explantats ont été rincés abondamment à l'eau stérile et séchés avec du papier stérile. Il est évident que l'action de la substance ne cesse pas immédiatement, car aucun processus expérimental ne permet d'éliminer rapidement et avec sûreté le "stock ingéré" non métabolisé. Les résultats doivent donc surtout être jugés d'une façon comparative .

Dans l'ordre, nous examinerons l'action :

- A. des différentes bases puriques et pyrimidiques, ou de leurs précurseurs et dérivés, en particulier les cytokinines,
- B. des auxines, seules ou en combinaison avec les cytokinines,
- C. des gibbérellines, seules ou en combinaison avec les cytokinines,
- D. des substances diverses, telles que la morphactine, l'acide abscissique ou les retardants .

Nous verrons que les conclusions dégagées à la suite d'une telle étude nous ont amené d'une part à tenter de préciser (par la méthode d'autohistoradiographie) le rôle de certaines hormones dans l'initiation de la première mitose conduisant à la mise en place des bourgeons, d'autre part à rechercher (par l'utilisation de certains analogues ou inhibiteurs) le moment où les cellules privilégiées sont induites à reprendre leur activité morphogénétique .

II - EFFETS DE L'APPLICATION DE QUELQUES SUBSTANCES ET HORMONES SUR LA NEOFORMATION D'ORGANES CHEZ BEGONIA REX.

A - Effets des bases puriques et pyrimidiques et de leur précurseurs et dérivés .

1. Introduction .

Il a été montré (Chap. IV) qu'un pourcentage élevé de zones privilégiées d'initiation est incapable d'entrer en activité mitotique. On peut donc se demander si cette inertie peut être reliée à une limitation naturelle du "pool" des précurseurs des bases puriques ou pyrimidiques, du "pool" des bases elle-mêmes ou du "pool" de leurs dérivés nucléosidiques, nucléotidiques, ou substitués. Un apport exogène dans les premières 24 heures pourrait donner un élément de réponse. Toutefois, ce type d'expérience doit être soumis à une critique sévère : en effet les substances envisagées peuvent pénétrer difficilement dans le matériel végétal et ne pas atteindre les cellules qui sont à l'origine des bourgeons; un équipement enzymatique déficient peut aussi ne pas permettre leur incorporation dans le métabolisme ; enfin, leur accumulation peut provoquer un effet de rétro-inhibition sur les enzymes nécessaires à leur métabolisation . Dans ces conditions un résultat nul présente des difficultés insurmontables pour l'interprétation. Quant à la méthodologie, il a été estimé qu'un contact de 24 heures avec les substances considérées était suffisant pour "l'approvisionnement" des explantats pendant les 4 premiers jours qui sont nécessaires à la réactivation des zones privilégiées .

2. Effet des précurseurs de bases puriques ou pyrimidiques.

Des précurseurs lointains, comme l'acide aspartique, la glutamine, la glycine, ou plus proches comme l'acide orotique, la xanthine, l'hypoxanthine et l'inosine ont été fournis aux fragments de feuilles, à la concentration de 10^{-4} M et 10^{-3} M . Aucune stimulation n'est décelable dans cette expérience. Elle ne permet donc en aucun cas de donner une conclusion formelle sur la présence ou l'absence d'un niveau d'approvisionnement suffisant en précurseurs dans les tissus .

3. Effet des bases puriques et pyrimidiques et de leurs dérivés ribosylés et phosphorylés .

Les tableaux 35 et 36 indiquent qu'un apport exogène précoce (au cours des premières 24 heures) de ces substances à différentes concentrations ne provoquent aucune stimulation du bourgeonnement. Par contre, la guanine et ses dérivés ont un effet inhibiteur net sur la morphogénèse, de même que l'acide thymidylique à la concentration de 10^{-4} M. D'une manière générale, l'application constante des bases puriques ou pyrimidiques ou de leurs dérivés dans le milieu de culture n'a pas d'action sur la morphogénèse, comme le montrent par exemple les résultats de Nitsch et collab. sur le Plumbago indica et la moelle de tabac (1967), de Doerschug sur les cotylédons de Lactuca sativa (1968), de Wardell et Skoog (1969) sur la tige de tabac. Par contre Paulet (1965) a pu déceler une certaine stimulation du bourgeonnement en utilisant les bases azotées en particulier la thymine à la concentration de 10^{-7} M. Comme nous l'avons déjà fait remarquer, il est bien difficile de discuter ces résultats. En ce qui concerne la pénétration des substances, on admet généralement que les bases et les nucléosides franchissent aisément la barrière membranaires et sont rapidement phosphorylés (Scholtissek, 1968 ; Nakata et Bader, 1969 ; Dorée et collab., 1970) . Par contre, les nucléotides pénètrent beaucoup plus difficilement (Scholtissek, 1968). Le fait que l'acide thymidylique à la concentration de 10^{-4} M provoque dans le cas de Begonia rex une inhibition du bourgeonnement montre que les nucléotides peuvent néanmoins être absorbés. Pour le matériel végétal, on possède peu de renseignement sur l'utilisation de ces composés préformés : on sait que l'adénine est très rapidement transformée en nucléotide triphosphate par une suspension cellulaire d'Acer pseudo-platanus (Dorée, 1970). En fait il est tout à fait vraisemblable que l'utilisation de ces substances dépende principalement du matériel d'expérimentation .

Enfin, il faut rappeler que chez les animaux et les bactéries la plus importante voie de synthèse des désoxyribonucléotides indispensables à l'initiation de la replication est la réduction des ribonucléotides par une réductase spécifique, la ribonucléotide réductase (Larson et

TABLEAU 35 : Action comparée des bases puriques, de leurs ribonucléosides et ribonucléotides, sur l'apparition des néoformations à partir d'explantats foliaires de *Begonia rex* (5 semaines de culture ; application des substances au cours des premières 24 heures suivant la séparation) .

Substances	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons / explantats	Intervalle de confiance de la moyenne	Nombre de racines / explantat	Nombre d'explantats présentant des troubles de polarité	Nombre de bourgeons dominants
Témoin traité par l'eau	11	12,7	+ 1,5	3	0	1,1
Adénine 10^{-6} M	11	9	+ 2,1	2,5	0	1,2
" 10^{-5} M	9	11,5	+ 4,5	3	0	1,9
" 10^{-4} M	11	9,8	+ 1,8	1,3	0	1,1
Adénosine 10^{-6} M	9	10	+ 2,3	3	0	1,1
" 10^{-5} M	12	11,1	+ 2,1	2	0	1,1
" 10^{-4} M	12	7,4	+ 1,2	2,6	0	1
Acide adénylique 10^{-6} M	13	6,6	+ 1,5	2,5	0	1
" 10^{-5} M	12	12,3	+ 4	3,3	1	1
" 10^{-4} M	12	10	+ 2,6	3	0	1
Guanine 10^{-6} M	13	11,7	+ 2,8	3,8	0	1,4
" 10^{-5} M	13	5,2	+ 2,0	0,5	0	1
" 10^{-4} M	12	2,5	+ 1,0	0,4	0	0,9
Guanosine 10^{-6} M	10	9,6	+ 2,4	4,2	0	1
" 10^{-5} M	10	8,7	+ 2,8	4,3	0	1
" 10^{-4} M	13	3,6	+ 1,5	0,7	0	1
Acide guanylique 10^{-6} M	12	12,9	+ 2,8	3,6	0	1,5
" 10^{-5} M	12	8,6	+ 1,7	1,7	0	1
" 10^{-4} M	12	4,2	+ 1,9	0,2	0	1

TABLEAU 36 - Action comparée des bases pyrimidiques, de leurs ribonucléosides et ribonucléotides, sur l'apparition des néoformations à partir d'explantats foliaires de *Begonia rex* (5 semaines de culture ; application des substances au cours des premières 24 heures suivant la séparation).

Substances	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons / explantat	Intervalle de confiance de la moyenne	Nombre de racines / explantat	Nombre d'explantats présentant des troubles de polarité	Nombre de bourgeons dominants
Témoin traité par l'eau	11	12,7	$\pm 1,5$	3	0	1,1
Cytosine 10 ⁻⁶ M	10	9,8	$\pm 2,5$	1,8	0	1,3
" 10 ⁻⁵ M	11	10	$\pm 1,2$	2	0	1
" 10 ⁻⁴ M	9	8,5	$\pm 1,7$	0,4	0	1,5
Cytidine 10 ⁻⁶ M	8	14,0	$\pm 3,0$	3,3	0	1,5
" 10 ⁻⁵ M	6	11,6	$\pm 3,0$	2	0	1
" 10 ⁻⁴ M	11	14,3	$\pm 2,0$	2,2	0	1,3
Acide cytidylique 10 ⁻⁶ M	11	18	$\pm 3,0$	3,3	0	1,1
" 10 ⁻⁵ M	13	16,5	$\pm 3,5$	3,4	0	1,5
" 10 ⁻⁴ M	12	16,5	$\pm 5,1$	3,0	0	1
Thymine 10 ⁻⁶ M	8	11,7	$\pm 4,0$	3,1	0	1,5
" 10 ⁻⁵ M	9	12,9	$\pm 3,3$	2,6	1	1,1
" 10 ⁻⁴ M	12	13,0	$\pm 4,2$	2,6	0	1,1
Thymidine 10 ⁻⁶ M	11	11,7	$\pm 3,5$	2,1	1	1,1
" 10 ⁻⁵ M	10	9,5	$\pm 2,0$	2,7	0	1
" 10 ⁻⁴ M	13	14,1	$\pm 2,5$	3,1	3	1,1
Acide thymidylique 10 ⁻⁶ M	10	10,0	$\pm 1,6$	2,1	0	1,8
" 10 ⁻⁵ M	13	11,5	$\pm 1,5$	2,2	0	1,1
" 10 ⁻⁴ M	13	4,6	$\pm 1,2$	0	0	0
Uracile 10 ⁻⁶ M	12	14	$\pm 3,4$	2,6	0	1
" 10 ⁻⁵ M	12	10	$\pm 2,0$	2	0	1,1
" 10 ⁻⁴ M	12	9,2	$\pm 2,4$	2	0	1,1
Uridine 10 ⁻⁶ M	6	14,1	$\pm 4,0$	3,5	0	1,1
Acide uridylique 10 ⁻⁶ M	10	20,2	$\pm 2,4$	3,1	0	1,2
" 10 ⁻⁵ M	11	16,6	$\pm 2,7$	3,1	0	1,1
" 10 ⁻⁴ M	11	12,9	$\pm 1,1$	1	0	1,1

Reichard, 1966 ; Odmark, 1969). Ces réactions sont susceptibles d'une régulation complexe par feed-back, à divers niveaux de la chaîne de synthèse. Il en est de même de la conversion d'un nucléotide en un autre ; ainsi, la transformation chez les bactéries de l'acide déoxycytidylique (dCMP) en acide déoxyuridylique (dUMP) menant à la synthèse d'acide déoxythymidylique (dTMP) est inhibé par les acides guanyliques (GMP), adényliques (AMP), déoxythymidylique et déoxyuridylique, mais activé par l'acide déoxycytidylique (Cohen, 1967). D'autre part, l'activité de la thymidinekinase est inhibée spécifiquement par le produit final de la réaction (Ives et collab., 1963 ; Takats, 1967). Dans notre cas, la réduction du bourgeonnement produite par la guanine et ses dérivés ou par l'acide thymidylique 10^{-4} M pourrait s'expliquer par un tel type de régulation.

Nous avons effectué des traitements par les nucléotides homologues en combinaison (AMP + UMP ou GMP + CMP) à la concentration de 10^{-5} et 10^{-4} M ; ceci n'a apporté aucun fait nouveau. Lorsqu'elle a été donnée seulement pendant les premières 24 heures, l'adénine n'a pas stimulé le bourgeonnement.

4. Effets de dérivés adényliques substitués en position 6 (cytokinines).

L'action stimulante du lait de coco sur la croissance d'explantats de carotte (Caplin et Steward, 1948) et sur le bourgeonnement (Skoog et Tsui, 1948) a été mise en évidence il y a plus de 20 ans. La première substance pure ayant ces propriétés, la kinétine, fut isolée par Miller et collab. en 1955 et identifiée comme une adénine substituée en position 6, possédant un groupement furfuryl. Depuis, d'autres substances naturelles ou synthétiques de la même famille chimique ont été reconnues comme également actives et ont été baptisées cytokinines (Pl. XXXXV). Il appartient à Skoog et collab. (1967) d'avoir déterminé les caractéristiques structurales nécessaires à cette activité.

Après la découverte de cytokinines, de nombreux auteurs ont montré l'action stimulatrice de ces substances sur le bourgeonnement. Des effets très divers ont pu être aussi décelés et on pourra se reporter à ce sujet aux mises au point de Helgeson (1968), Letham (1967), Nitsch (1968), Srivastava (1967), Xhaufflaire et Gaspar (1968) .

L'étude précédente (Chap. IV) a bien montré que l'espèce étudiée possède des cellules hautement spécialisées (bien que différenciées), qui sont à l'origine des bourgeons. Nous avons donc recherché si l'action spécifique des cytokinines sur le bourgeonnement s'exerçait aussi dans ce cas et, éventuellement, d'une manière exclusive sur ces cellules .

a. Effet d'un apport exogène sur le bourgeonnement
(Bigot, 1966 ; Bigot et Chlyah, 1970) .

1 - Comparaison de diverses cytokinines .

Cette expérience a été mise en place de façon à choisir la cytokinine qui convenait le mieux à une stimulation répétable du bourgeonnement. Les résultats sont traduits par la figure 1 de la planche XXXXVI .

Deux cytokinines naturelles, la zéatine (4-hydroxy-3-méthyl-but-trans-2-enylaminopurine) et l'isopentenyladenine (6-gamma-gamma-diméthylallylaminopurine) n'ont pas donné à des concentrations égales ou inférieures à 10^{-4} M de stimulation importante du bourgeonnement, ce qui pourrait s'expliquer par la présence dans les végétaux supérieurs de systèmes enzymatiques dégradant rapidement ces substances (Nitsch et Bui, 1967). Toutefois, à la concentration de 10^{-4} M, on peut déceler à la loupe une très forte initiation mitotique (mamelons) au niveau de nombreux poils glanduleux : cet arrêt de l'évolution des points de morphogenèse avant la phase organogène pourrait être lié à un fort pourcentage de cellules polyploïdes (Torrey, 1961 ; Matthyse, 1967). L'isopentenyladenine à la concentration de 10^{-3} M a été écartée, malgré une forte stimulation, à cause des malformations et de la lenteur de développement des ébauches .

Par contre la 6-benzylaminopurine et la S. D. 8339 (6-benzyl-9-tétrahydropyrane aminopurine) ont provoqué, dès la concentration de 10^{-5} M, une multiplication des points caulinaires, une dépolarisation de leur formation et une inhibition complète de la rhizogenèse, qui se prolonge pendant plus de 3 mois, jusqu'à la mort des explantats. Cette inhibition se "transmet" aux bourgeons eux-même qui ne différencient aucune racine adventive. La croissance des ébauches est relativement lente. La concentration la plus élevée (10^{-3} M) ralentit fortement l'apparition de points caulinaires fonctionnels (ainsi dans une expérience, on a pu dénombrer avec la benzylaminopurine (10^{-3} M) 124 bourgeons fonctionnels par explantat au bout de 3 mois, contre 28 après 5 semaines seulement de culture). A la suite de cette étude comparative, la benzyl aminopurine, à la concentration de 10^{-4} M ou 10^{-5} M suivant les expériences, a été choisie comme substance stimulatrice du bourgeonnement sur des explantats foliaires de Begonia rex.

B - Influence de la durée du traitement par la benzylaminopurine à la concentration de 10^{-4} M sur le bourgeonnement .

Les résultats de cette étude sont donnés dans la figure 2 de la planche XXXXVI. La courbe 1 indique le nombre total de néoformations obtenues par explantat après un temps de contact donné. On note que 30 minutes suffisent pour amorcer une stimulation de la caulogenèse, s'accompagnant d'une dépolarisation. Ces phénomènes s'accroissent avec l'augmentation de la durée du traitement, avec une certaine variabilité. Il a été défini sur l'explantat une zone proximale, limitée aux 2 premiers millimètres adjacents à la blessure du côté pétiole, site naturel de la morphogenèse, et une partie distale, qui inclut toute la surface de l'explantat. Dans le dénombrement, les bourgeons de ces 2 régions ont été séparés, ce qui permet de construire les courbes 2 (partie distale) et 3 (zone proximale). Par la courbe 2, on note la dépolarisation et la multiplication progressive des points caulinaires, en fonction de la durée du traitement. Par contre, du côté de la zone proximale, la courbe 3 est à tendance asymptotique et on peut prévoir, après une dizaine d'heures

de contact, que toutes les zones privilégiées d'initiation ont été stimulées ; il sera montré (fig. 4) que cette hypothèse est exacte. De façon à obtenir un effet maximal, la durée du traitement a été fixée en général à 24 heures, mais il est notable qu'un contact court de 30 minutes à 1 heure provoque déjà une augmentation significative du nombre de bourgeons. Nous avons alors cherché à réverser cette action par un lavage par l'eau aussitôt le traitement effectué, de façon à savoir si la benzylaminopurine accumulée dans l'explantat, se fixe immédiatement au niveau de structures cellulaires ou peut encore être éliminée par diffusion .

Y - Influence d'un lavage par l'eau appliqué immédiatement après un traitement par la benzylaminopurine à la concentration de 10^{-4} M .

Les résultats du tableau 37 indiquent, qu'on ne peut annuler l'action de la benzylaminopurine par un traitement par l'eau après l'application de cette substance. Ceci signifie soit que la cytokinine est fixée énergiquement et immédiatement au niveau d'une structure cellulaire, soit que la métabolisation (c'est-à-dire sa transformation en nucléoside et nucléotide) est très rapide. Dans des conditions un peu différentes, Brandes et Kende (1968) montrent que l'action stimulante de la benzylaminopurine sur le bourgeonnement de protonema de mousse est réversible après 24 heures de contact si on opère un transfert des cultures sur un milieu neuf sans hormone. Par contre, cette action devient irréversible après 72 heures. Kulayeva (1967) rapporte que la distribution de cette substance (marquée au ^{14}C sur le C_7) dans les différentes structures cellulaires de feuilles d'orge est homogène, après 3 heures de contact ; l'intensité de cette fixation est bien supérieure à celle de l'adénine marquée donnée dans les mêmes conditions. On sait que la benzylaminopurine, par ces affinités lipophile, doit pénétrer plus rapidement dans les cellules (Guern, 1965) et atteindre les sites d'action en un temps de traitement très court ; ce fait est remarquable pour le matériel végétal envisagé .

TABLEAU 37 - Influence d'un traitement par l'eau sur les capacités de néoformation d'explantats foliaires de Begonia rex stimulés préalablement au bourgeonnement par la benzylaminopurine (BA) à la concentration de 10^{-4} M (les applications sont faites par flottaison).

Traitements :	Nombre d'explantats :	Nombre de bourgeons / explantat :	Nombre de racines / explantat :	Nombre d'explantats présentant une dépoliarisation du bourgeonnement :
Eau pendant 8 h	12	15, 9	2, 5	0
BA pendant 30 minutes	13	41, 4	2	13
" " → eau (2 h.)	13	34, 7	2	13
BA pendant 1 heure	11	69, 9	2	11
" " → eau (2 h.)	13	58, 0	2, 1	13
BA pendant 2 heures	12	106	0	12
" " → eau (2 h.)	13	72, 2	2	13
BA pendant 3 heures	12	81, 8	0	12
" " → eau (2 h.)	11	77, 1	0	11
BA pendant 4 heures	12	89, 1	0	12
" " → eau (2 h.)	12	89, 9	0	12
BA pendant 8 heures	12	136	0	12

✓ - Action d'un traitement localisé par la benzylaminopurine .

Par cette expérience, nous avons recherché si la cytokinine donnée localement (explantats de 4 cm) pendant les premières 48 heures pouvait entraîner une dépolarisation de la morphogenèse, à un moment où il n'y a aucun appel moléculaire dû à des organes en voie de développement, appels susceptibles de provoquer le déplacement de cette substance . Les applications ont été faites par gouttes (dépôt ou piqure) à au centre de l'explantat ou à la section distale ; la benzylaminopurine est utilisée à la concentration de 10^{-4} M . Après le traitement, les explantats ont été lavés à l'eau distillée. Le tableau 38 donne les résultats de cette expérience .

Il apparaît bien que la benzylaminopurine produit une stimulation du bourgeonnement au point d'application lorsqu'il y a une blessure par piqure. Mais il n'y a pas d'accroissement du bourgeonnement du côté de la section proximale ni de dépolarisation de la morphogenèse. Il est donc tout à fait vraisemblable que la substance n'a pas circulé dans l'explantat ce qui confirme les résultats selon lesquels le déplacement de ces substances s'effectue sous l'impulsion d'appels moléculaires provoqués par des organes en voie de développement (Guern, 1966). Un autre argument est que la rhizogenèse, d'habitude très sensible à l'action inhibitrice des cytokinines, s'effectue normalement du côté proximal. Par cette méthode nous avons créé une deuxième zone de morphogenèse qui entre en compétition avec la zone proximale ; après 3 mois, la croissance des ébauches initiées au niveau de cette deuxième zone est généralement inhibée, et ceci d'autant plus qu'elles sont plus éloignées de la section proximale. Ceci pourrait être un argument supplémentaire concernant l'intervention de gradients de substances dans la polarité de développement des bourgeons ; enfin, aucune racine ne se forme au point de traitement .

TABLEAU 38 - Action d'un traitement localisé par la benzylaminopurine (BA) à la concentration de 10^{-4} M sur la morphogénèse d'explantats foliaires de Begonia rex (l'eau et la substance stimulant le bourgeonnement sont déposées par gouttes avec une seringue Pyrex de 1/4 de ml ; 2 gouttes par traitement ; explantats de 4 cm)

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons/ explantat à la section proximale	Nombre de racines/ explantat à la section proximale	Nombre de bourgeons au point traité / explantat	Nombre de racines au point traité/ explantat	Nombre d'explantats ayant bourgeonné au point traité	Nombre d'expl. bourgeonnant en dehors du point traité ou de la sect. proximale
Sans traitement	12	18,3	3,8	-	-	-	0
Piqûres au centre de l'explantat	12	13,7	4,0		0	1	0
Eau avec piqûres au centre de l'explantat	12	12,9	3,5	0	0	0	0
Eau sans piqûre au centre de l'explantat	12	16,3	3,4	0	0	0	0
BA sans piqûre au centre de l'explantat	12	13,1	4	0	0	0	0
BA avec piqûre au centre de l'explantat	13	16,8	6,3	<u>10</u>	0	<u>13</u>	1
Eau avec piqûres à la section distale	12	14,8	1,3	0	0	0	0
BA avec piqûres à la section distale	11	13,7	5,0	<u>12,2</u>	0	<u>10</u>	0

- Conclusion sur l'action d'un traitement exogène par les cytokinines.

D'après les expériences précédentes, on peut formuler les conclusions suivantes :

1. L'intensité du bourgeonnement obtenu à partir d'explantat foliaire de Begonia rex peut être contrôlé par l'application exogène d'une cytokinine en solution aqueuse aussitôt après la séparation des fragments. Le traitement a une action même s'il est appliqué pendant une période très courte (30 minutes à 3 heures). Dans ces conditions, les bourgeons peuvent se différencier sur toute la surface du limbe (absence de polarité) (Pl. XXXXVII, fig. 1). Aucun autre facteur exogène n'est requis pour une telle stimulation. Il se pourrait que la fixation de ces substances au niveau des structures cellulaires s'effectue sans délai, au moins pour l'une d'entre elles, la benzylaminopurine. Dans le cas du Begonia rex, une semblable action a été trouvée par Schraudolf et Reinert (1959) et par Chlyah (1969) ; mais, bien avant, Prévot (1937) avait déjà montré le rôle stimulateur d'engrais à base d'excréments de pigeons très riches en composés puriques. Ainsi, il fut le premier à mettre en évidence, sans le soupçonner, le rôle de ces substances dans la néoformation des bourgeons. Notre expérience montre que la seule limitation naturelle du "pool" de telles substances pourrait provoquer une inaptitude totale ou partielle à la néoformation : nous avons tenté de confronter cette hypothèse avec l'expérience en prouvant le bourgeonnement chez d'autres espèces de Begonia, n'ayant pas naturellement cette capacité (Pl. XXXXVII, fig. 2 et 3). Ainsi le Begonia socotrana s'est montré sensible à un traitement par la benzylaminopurine. Il se forme en effet sur les fragments foliaires soit des bourgeons fonctionnels, soit des néoformations tératologiques, dont les pièces, très anthocyaniques, pourraient traduire une expression florale (Bigot, 1966) ; de fait, sur les pétioles de cette espèce, Ringe et Nitsch (1968) ont pu obtenir des néoformations florales in vitro, ce qui confirme cette première observation. Le Begonia gigantea wall. donne aussi des bourgeons en grand nombre, si le facteur cytokinine est appliqué pendant toute la durée de la culture (milieu minéral de Knop).

Par contre, le Begonia (x) Comte de Miribel Bruant (B. albopicta Hort (x) B. corallina Carr.) ne réagit pas à l'application, même prolongée, d'une cytokinine. D'autres conditions sont donc ici nécessaires à la néoformation des bourgeons. Heide (1965) a aussi obtenu le bourgeonnement après application de cytokinines chez d'autres espèces (Begonia semperflorens, B. hiemalis, B. cheimantha "Regent", B. socotrana "President") ; ce même auteur indique que la teneur en cytokinines endogènes et la propension à former des bourgeons varient dans le même sens .

2. A partir de la concentration de 100 μ M, l'inhibition de la rhizogenèse est manifeste ; l'antagonisme entre les cytokinines et l'enracinement est donc une fois de plus vérifié .

3. On observe une réduction de la croissance des ébauches et une perte de la dominance. La réduction de la croissance en longueur sous l'action de ces substances a été observée par exemple dans le cas d'hypocotyles d'amarante (Bgot, 1968) ou de tomates (Pegg, 1962) et dans le cas de tiges de pois (Miller, 1956). Par contre, on note une stimulation de la croissance en surface pour des fragments foliaires (par exemple, Esashi et Leopold, 1969 ; dosage des cytokinines). On peut remarquer, à propos de notre matériel, que la présence de très nombreux points caulinaires sur un explantat de surface réduite peut entraîner, sans apport extérieur, un épuisement rapide en facteurs de croissance (hormones, vitamines...), mais nous avons remarqué que la culture sur milieu gélosé complet ne modifie pas ce phénomène. Il faut rappeler que la racine est considérée comme un lieu possible de synthèse des acides aminés ou d'hormones (acide gibbérellique) : l'absence complète de néoformations racinaires pourrait être une cause de la réduction de croissance et de la perte de dominance .

4. Les substances déposées localement stimulent le bourgeonnement au point d'application seulement : il n'y a donc pas vraisemblablement de

circulation de celles-ci dans l'explantat ; seul, un traitement par flottaison sur des solutions aqueuses peut assurer une répartition convenable de ces substances .

Pour terminer il faut souligner que la benzylaminopurine, donnée pendant le 1er jour seulement à partir de la concentration de 10^{-5} M :

- inhibe la formation des racines et des bourgeons sur des explantats foliaires de Peperomia ; ce fait, déjà souligné par Harris et Hart (1964), confirme la stricte dépendance du bourgeonnement et de l'enracinement pour ce genre (Chap. IV) .
- n'a aucune action sur la caulogenèse à partir d'écailles de Lilium .

En fonction des résultats obtenus avec le Begonia rex, il était intéressant de savoir si l'action stimulante des cytokinines (en particulier celle de la benzylaminopurine) s'exerçait spécifiquement sur les cellules privilégiées qui donnent naissance aux bourgeons. Cette recherche fait l'objet du paragraphe suivant .

b . Lieu et précocité de l'action de la benzylaminopurine (Bigot et Chlyah, 1970) .

Les résultats exposés ci-dessous n'ont pu être obtenus qu'après une observations systématique des coupes histologiques pratiquées dans les explantats fixés à des moments différents, après un traitement de 24 heures par la substance à la concentration de 10^{-4} M . Les résultats en ont été réunis dans le tableau 39 et dans les figures 3 et 4 de la planche XXXXVI, résultats auxquels on ajoutera les observations suivantes :

- A la fin de la période de traitement (1er jour), aucune réactivité nucléolaire, aucune mitose n'est encore décelable dans le lot traité comme le lot témoin. Il a été montré que dans de nombreux cas que l'intiation mitotique nécessite deux facteurs : une cytokinine et une

auxine. On remarquera qu'une augmentation naturelle du taux des substances stimulant la croissance des mésocotyles d'avoine peut être décelée 3 jours après l'isolement des explantats (Chap. VII). C'est aussi le moment où les premières mitoses apparaissent.

- Après 3 jours, on constate que les divisions cellulaires sont amorcées pour le lot témoin (H_2O) et pour le lot traité (BA). Toutefois, il n'y a pas de stimulation nette sur l'ensemble de l'explantat dans ce dernier cas (7,5 % des Z.P.I. en mitose, contre 5,3 % chez le témoin) ; il y a même une diminution du nombre des initiations si on prend seulement en considération la section proximale. Par contre, si on juge l'action de la benzylaminopurine par le nombre de zones privilégiées d'initiation (Z.P.I.) activées (affinité nucléolaire et nucléaire plus grande pour la pyronine, s'accompagnant d'une augmentation de volume du noyau et du nucléole), les résultats sont différents. Pour la face supérieure, on a :

- traitement par l'eau : nombre de Z.P.I. activées : 7,5 % ,
- traitement par la benzylaminopurine : nombre de Z.P.I. activées : 26,3 % .

Cette activation, due à l'action de la benzylaminopurine, apparaît donc d'une manière très précoce, précédant l'initiation mitotique pour un nombre croissant de Z.P.I.. Cette initiation mitotique est décelable après 5 jours. Ce fait est à rapprocher des observations de Coddacioni et Usciati (1970) qui montrent au niveau du nucléole et du cytoplasme une reprise de coloration par la pyronine, s'accompagnant d'une augmentation du diamètre du nucléole dans les premières heures suivant un traitement par la benzylaminopurine, dans le cas de méristèmes végétatifs de Cicer arietinum ; après 6 heures, l'incorporation d'uridine tritiée (Usciati et collab., 1970) est stimulée, ainsi que les mitoses. Il est raisonnable de penser que les processus sont identiques pour le *Begonia rex* , bien que mpins rapides : les cellules sont en effet ici totalement différenciées, et leur activation est sans doute plus lente que celle de cellules déjà méristématiques au moment du traitement .

- Après 5 jours, la reprise d'activité des Z.P.I. s'effectue progressivement pour le lot traité par l'eau (13,3 % en mitoses). Dans le cas du lot traité à la benzylaminopurine, les zones d'initiation activées après 3 jours d'isolement (soit 26,3 %) sont entrées dans la phase de division (28,2 % des Z.P.I.). En aucun cas, la benzylaminopurine n'a été capable de stimuler les divisions cellulaires en dehors des cellules privilégiées. La dépolarisation s'amorce lentement (4,9 %). Le processus de mise en place du bourgeon est comparable à celui qui a lieu pour le témoin. La cellule basale du poil glanduleux ne participe pas à l'édification du ~~mé~~ristème ainsi qu'il a déjà été noté dans le cas du témoin.

- Après 7 jours, 95 % des zones privilégiées d'initiation sont stimulées dans la zone proximale. L'absence de divisions cellulaires en dehors des cellules adjacentes au poil planguleux se confirme au cours des jours suivants (Pl. XXXXVII, fig. 4).

En conclusion, la benzylaminopurine est incapable au cours des 13 premiers jours d'induire des mitoses dans des cellules épidermiques autres que celles qui constituent la zone privilégiée d'initiation des bourgeons (cellules épidermiques qui entourent la cellule basale du poil glanduleux). Seules, ces cellules, bien localisées, sont sensibles à l'action de cette substance, ce qui confirme leur état particulier de réceptivité. Ce caractère est particulièrement intéressant pour une étude plus précise de l'initiation des bourgeons au cours des 5 premiers jours suivant la séparation; le poil glanduleux constituant un marqueur exceptionnel de cette initiation (cette propriété sera largement utilisée par la suite). En particulier, un traitement par la benzylaminopurine permet à la fois de renforcer le message morphogénétique et de synchroniser partiellement la réponse des cellules privilégiées. Dans le cas des mousses, Brandes et Kende (1968) montrent que cette même substance active la formation des bourgeons (concentration optimale 1 μ M) à partir de cellules bien définies du caulonema, cellules qui donnent naissance habituellement aux pousses feuillées. Ils indiquent

TABLEAU 39 - Tableau récapitulatif des observations histologiques .

(traitement des explantats pendant 24 heures à l'obscurité, à la température de 22° C, soit par l'eau, soit par la benzylaminopurine 10⁻⁴ M - développement en jours continus à la température de 24-27° C). On appelle zone privilégiée d'initiation (Z. P. I.) l'ensemble : poil glanduleux et cellules épidermiques adjacentes ; côté proximal : les 2 premiers millimètres adjacents à la blessure du côté pétiolaire de l'explantat ; partie distale : le reste de l'explantat .

Trait.	Nombre de jours après l'isolement	Nombre de coupes observées	Nb de Z. P. I. face supér. de l'expl.	% de Z. P. I. en mitose	Nb de Z. P. I. face supér. du côté proximal	% de Z. P. I. en mitose du côté proximal	Nb de Z. P. I. face supér. partie distale	% de Z. P. I. en mitose sur la partie distale	Nb. de Z. P. I. face infér. de l'expl.	% de Z. P. I. en mitose
traité par l'eau	0 jour	456	391	0	-	-	-	-	275	0
	1 jour	445	225	0	39	0	186	0	-	-
	3 jours	317	132	5,3	34	20	98	0	310	0
	5 jours	458	233	13,3	78	39,7	155	0	505	0
	7 jours	486	458	13,1	171	31,5	287	2,9	-	-
	11 jours	366	150	17,3	40	60	110	0,9	-	-
	13 jours	516	240	20,0	66	44	174	11	-	-
	1 jour	324	284	0	75	0	209	0	-	-
traité par la benzylaminopurine	3 jours	569	239	7,5	118	15,2	121	0	653	2,1
	5 jours	547	499	28,2	168	74,3	331	4,9	835	3,7
	7 jours	303	206	20,8	66	51,5	140	6,4	-	-
	9 jours	371	223	50	89	88,7	134	17,1	-	-
	11 jours	501	316	65	129	95,4	187	46,4	-	-
	13 jours	337	353	54,1	133	95,5	220	29	-	-

que la substance doit être donnée 1 ou 2 jours avant l'initiation du développement des bourgeons et doit être toujours présente pendant celle-ci. Il semble donc que l'activation de la formation des bourgeons par cette hormone requiert un état physiologique particulier : on note en particulier dans le dernier cas cité que la benzylaminopurine marquée s'accumule préférentiellement dans les cellules privilégiées (autohisto-radiographie). On peut donc comparer avec profit ces deux matériels.

En résumé, les résultats d'expériences faisant intervenir d'une manière exogène les bases puriques et pyrimidiques et leurs dérivés au cours des premières 24 heures indiquent que seules les adénines substituées en position 6 sont capables de stimuler le bourgeonnement. Il se pourrait donc que le métabolisme de l'adénine ait une importante particulière dans le déterminisme du bourgeonnement. On a alors tenté d'utiliser soit des antipurines comme la 2,6-diaminopurine ou l'azadénine pour troubler ce métabolisme, soit certains composés comme les barbiturates qui forment des ponts hydrogènes spécifiques et très stables avec les dérivés de l'adénine (Kyogoku, 1968) .

5. Effets de certaines antipurines ou d'inhibiteurs du cycle de l'adénine sur l'aptitude à la néoformation chez Begonia rex .

Suivant les expériences, la 2,6-diaminopurine est donnée seule ou en présence d'adénine, au cours des premières 24 heures ou en traitement différé, avec ou sans stimulation préalable par la benzylaminopurine. Seuls les résultats les plus intéressants sont rapprochés dans les tableaux 40 et 41 et les figures des planches XXXXVIII et XXXXIX ; il permettent d'exprimer les conclusions suivantes :

a. La 2,6-diaminopurine inhibe la formation des bourgeons, partiellement à la concentration de 10^{-5} M, totalement à la concentration de 10^{-4} M, après 5 semaines de culture (Pl. XXXXVIII) .

Toutefois, de nombreux points caulinaires non fonctionnels sont initiés ; il se forme : souvent du côté proximal une expansion calliforme assez volumineuse et très chlorophyllienne ; ceci indique que les mitoses ne sont pas empêchées par cette substance .

b. L'étude histologique montre qu'après 5 semaines, 85 % des zones privilégiées ont effectivement commencés leur activité mitotique (311 zones ont été observées) ; il y a donc eu une stimulation par rapport au témoin, chez qui 25 % des zones privilégiées seulement sont dans un état comparable. Les points caulinaires ont une structure assez homogène (1 ou 2 feuillets tunicals) ; on note l'absence de vascularisation reliant le point caulinaire au système conducteur de la feuille mère . C'est donc l'état dans lequel se trouve les bourgeons dominés du témoin. On remarque que toutes les cellules de ces points caulinaires ont conservé leurs caractères méristématiques. Enfin il peut y avoir une forte accumulation d'amidon au niveau de la zone proximale des explantats .

c. D'une manière naturelle, après 8 semaines, il y a rétablissement partiel du fonctionnement des points caulinaires ; aucune dominance ne se manifeste alors. On observe aussi quelques modifications morphologiques : les feuilles formées sont plus petites, plus épaisses, très anthocyaniques et souvent plus pilifères (Pl. XXXIX, fig. 2) .

d. De façon à s'assurer que le métabolisme de l'adénine a bien été perturbé par le traitement, il a été tenté de réverser l'action de la 2, 6-diaminopurine par l'adénine. Comme le montre le tableau 41 cette réversion est possible et peut être complète . On observe même par rapport aux explantats qui bourgeonnent une stimulation de la morphogenèse après un traitement par la 2, 6-diaminopurine à la concentration de 10^{-4} M réversé par l'adénine à la concentration de 10^{-3} M, ceci est en accord avec les résultats histologiques,

TABLEAU 40 - Effet de la 2,6-diaminopurine (2, 6-DAP) à 2 concentrations ($5 \cdot 10^{-5}$ M et 10^{-4} M) appliquée au cours du 1er jour et du 4ème jour (moment de l'initiation des bourgeons) après l'isolement des explantats de Begonia rex.

Moment du traitement et moment de l'observation	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons / explantat	Intervalle de confiance de la moyenne	Observations
<u>Observations après 5 semaines</u> Témoin traité par l'eau le 1er jour	11	14,9	+ 0,7 - 0,7	Développement normal
Témoin traité par l'eau le 4ème jour	15	11,1	+ 1,2 - 1,2	Développement normal
2, 6-DAP 5×10^{-5} M le 1er jour	9	0	-	Expansion calliforme au niveau de la section proximale de la nervure. Nombreux points caulinaires non fonctionnels. Les divisions cellulaires ne sont pas inhibées.
2, 6-DAP 5×10^{-5} M le 4ème jour	11	0	-	Mêmes observations que précédemment.
2, 6-DAP 10^{-4} M le 1er jour	12	0	-	Aucun point caulinaire visible.
2, 6-DAP 10^{-4} M le 4ème jour	12	0	-	Aucun point caulinaire visible.
<u>Observations après 9 semaines</u> 2, 6-DAP 5×10^{-5} M le 1er jour	9	9,0	+ 5,2 - 5,2	Expansion calliforme très chlorophyllienne. Les feuilles produites sont très anthocyaniques, peu découpées, à bords enroulés.
2, 6-DAP 5×10^{-5} M le 4ème jour	11	0	-	Nombreux points caulinaires non fonctionnels.
2, 6-DAP 10^{-4} M le 1er jour	12	0	-	Nombreux points caulinaires non fonctionnels.
2, 6-DAP 10^{-4} M le 4ème jour	12	0	-	Aucun point caulinaire.

TABLEAU 41 - Réversion par l'adénine (AD) de l'action inhibitrice de la 2, 6-diaminopurine (2, 6-DAP) sur le bourgeonnement de Begonia rex.

Traitement et moment de l'observation :	Nombre d'explantats :		Nombre de bourgeons/ explantat :	Intervalle de confiance de la moyenne (Po, o5):	Nombre de racines/ explantats :
	<u>total</u>	<u>avec bourg.</u>			
<u>Après 5 semaines</u>					
Témoin	14	14	12, 2	+ 1, 1 - 1, 1	3, 2
AD. 10^{-4} M	16	16	12, 8	+ 3, 2 - 3, 2	
AD. 10^{-3} M	15	15	12, 0	+ 2, 4 - 2, 4	
2, 6-DAP 10^{-5} M	18	11	5, 8	+ 3, 0 - 3, 0	0
2, 6-DAP 10^{-4} M	14	0	0	-	0
2, 6-DAP 10^{-5} M + AD. 10^{-4} M	26	22	10, 0	+ 2, 5 - 2, 5	1
2, 6-DAP 10^{-4} M + AD. 10^{-3} M	24	0	0	-	0
<u>Après 9 semaines</u>					
2, 6-DAP 10^{-5} M + AD. 10^{-4} M	25	25	12, 5	+ 3, 0 - 3, 0	2, 9
2, 6-DAP 10^{-4} M + AD. 10^{-3} M	24	12	11, 1	+ 5, 1 - 5, 1	0
2, 6-DAP 10^{-4} M + AD. 10^{-3} M résultats rapportés au nombre d'explantats qui bourgeonnent	12	12	<u>22, 2</u>	+ 4, 7 - 4, 7	0

rapportés précédemment. Par contre, la benzyl aminopurine est incapable d'annuler l'inhibition de bourgeonnement due à la 2,6-diaminopurine ; bien plus, cette dernière réduit l'effet stimulant de la cytokinine. Ces faits laissent supposer que les 2 substances agissent à des niveaux différents dans le métabolisme .

e. Enfin, au cours des premières 24 heures, des traitements différés par la 2,6-diaminopurine n'apportent aucune précision supplémentaire. Par contre, l'effet de l'application effectuée au cours du 4ème jour après la séparation, à un moment où s'amorcent les divisions constitutives des points caulinaires n'est pas naturellement réversibles (Pl. XXXXIX, fig. 2). Ce moment apparaît donc comme particulièrement important pour l'expression de l'aptitude au bourgeonnement et la perturbation du métabolisme de l'adénine entraîne alors une inhibition définitive de la morphogénèse. On notera qu'une autre antipurine, l'aza-adénine, n'a aucun effet sur le bourgeonnement. Il en est de même d'un barbiturate, le phénobarbital, donné au cours des premières 24 heures aux concentrations comprises entre 10^{-6} M et 10^{-4} M .

f. En conclusion, on doit souligner que la 2,6-diaminopurine, dont l'action inhibitrice est réversible par l'adénine ou s'élimine naturellement au cours du temps, perturbe l'information morphogénétique conduisant à la structuration du méristème caulinaire ; par contre, l'initiation mitotique semble stimulée. Nous nous attacherons dans d'autres expériences à vérifier ce fait .

B - Effets de l'application conjuguée d'une auxine (acide naphthalène-acétique) et d'une cytokinine (benzyl aminopurine) .

Les planches L et LI résument l'action conjuguée de ces deux substances, données au cours des premières 24 heures dans le cas de Begonia rex. Cette expérience confirme des résultats désormais classiques;

1. Antagonisme des auxines et des cytokinines dans le phénomène de la néoformation d'organes . .
2. Synergie possible pour le bourgeonnement, à certaines concentrations ; ici les combinaisons BA 10^{-4} M et ANA 10^{-4} M, ou BA 10^{-5} et ANA 10^{-5} M se sont montrées plus actives que les concentrations similaires de la benzylaminopurine seule .
3. Lorsque les substances sont données ensemble, la benzylaminopurine (à partir de la concentration 10^{-5} M) a une action dominante : c'est en effet la rhizogenèse qui est alors inhibée. Remarquons que l'ANA ne provoque pas le plus souvent de dépolarisation de la rhizogenèse (circulation des auxines) .

La même expérience a été réalisée sur milieu de Murashige et Skoog avec des explantats pétiolaires de Begonia rex (tableau 42 et pl. LII). Elle fournit des résultats sensiblement identiques : on doit toutefois souligner que la benzylaminopurine à la concentration de 10^{-5} M inhibe fortement la croissance des ébauches et entraîne une dépigmentation. L'acide naphthalène-acétique stimule vigoureusement la rhizogenèse, qui est alors dépolarisée lorsque l'application est continue ; à la concentration de 10^{-6} M, la croissance des bourgeons est fortement augmentée par rapport au témoin. Pour ce dernier, si la section distale est placée en dehors du milieu, il n'y a pas formation de racines, mais quelques bourgeons apparaissent. Autrement dit, sur les explantats pétiolaires, la polarité naturelle du développement des bourgeons est moins stricte que sur les explantats foliaires .

Enfin très brièvement, quelques résultats obtenus avec d'autres espèces seront rapportés ci-dessous :

1 - Begonia socotrana, qui ne forme pas naturellement de bourgeons, réagit d'une manière identique à Begonia rex lorsque les explantats sont traités par des combinaisons hormonales .

TABLEAU 42 - Action conjuguée de l'acide naphthalène-acétique (ANA) et de la benzylaminopurine (BA) sur la morphogénèse à partir de fragments pétiolaires de Begonia rex (milieu de Murashige et Skoog ; résultats relevés après 8 semaines de cultures ; sauf indication contraire, les explantats sont ensemencés à plat sur le milieu) .

Traitements	Caulogénèse			Rhizogénèse			Observations
	Intensité	Vigueur	Polarité	Intensité	Vigueur	Polarité	
Témoin	++	+++	non	+	+++	oui, côté proximal	bourgeons disposés d'une manière quelconque .
Témoin, côté proximal vers le haut	++	++	oui, côté proximal	++	+++	oui, côté proximal	bourgeons sur le pourtour de la section proximale .
Témoin, côté distal vers le haut	+	+	oui, côté distal	0	-	-	Aucune racine ne se forme .
BA 10^{-5} M	+++	0	non	0	-	-	Toxicité de la BA vis-à-vis de la croissance des bourgeons .
BA 10^{-6} M	+++	+	non	0	-	-	
ANA 10^{-5} M	0	-	-	+++++	+++	non	pas de tuméfaction des racines
ANA 10^{-6} M	+	+++++	oui, côté proximal	+++++	+++	non	très forte vigueur des bourgeons
BA 10^{-5} M + ANA 10^{-5} M	++	0	non	0	-	-	Toxicité - dépigmentation (chlorophylle et anthocyane)
BA 10^{-5} M + ANA 10^{-6} M	+++	+	non	0	-	-	Légère dépigmentation
BA 10^{-6} M + ANA 10^{-6} M	++	++	non	++	++	non	Disparition de la polarité .

2. Peperomia griseo-argentea est très sensible à l'action de la benzylaminopurine : à la concentration de 10^{-6} M (pendant 24 heures) la rhizogenèse est totalement inhibée. Il suffit d'un contact de 1 heure à la concentration de 10^{-4} M pour empêcher toute rhizogenèse, et il n'y a dans ce cas aucune caulogenèse. La stimulation de la formation des racines par les auxines (acide naphthalène acétique ou indolbutyrique) est possible, mais les racines sont courtes, trapues, très ramifiées et les bourgeons (qui leur sont liés) ne se différencient pas. A la concentration de 10^{-3} M, la benzylaminopurine provoque l'apparition sur certains explantats de quelques bourgeons, sans rhizogenèse apparente. Il en est de même pour Peperomia magnoliaefolia, avec possibilité d'une dépolarisation (Pl. LIII, fig. 4) .

3. L'acide naphthalène-acétique ou l'acide indolbutyrique à la concentration de 10^{-4} M, donné pendant les premières 24 heures provoque une forte stimulation de la formation de bulbilles dans le cas de Lilium (x) "Enchantment" et martagon (Pl. LIII, fig. 1 à 3) alors que la benzylaminopurine est sans effet. Par contre, aucune racine ne se forme à partir de l'écaille après le traitement par des auxines ; toutefois la rhizogenèse à partir des bulbilles est accrue. Pour ces deux espèces, on ne peut donc révéler une capacité latente à la rhizogenèse à partir des écailles par un "messenger chimique" tel qu'une auxine . La stimulation de la caulogenèse par les auxines avait déjà été notée par Chouard à partir des feuilles d'Endymion non scriptus (1938), résultat que nous avons retrouvé aussi avec la même espèce. Comme cela a déjà été exposé (Chap. VI), les écailles de lis sont riches en substances ayant une action de cytokinine ; un apport exogène d'auxine peut modifier l'équilibre relatif de ces deux types de substances dans un sens favorable à la caulogenèse ; cette hypothèse permettrait d'expliquer un résultat qui peut paraître surprenant .

C - Effets de l'acide gibbérellique .

1. Introduction

Le rôle de l'acide gibbérellique sur l'activité mitotique a été mis en évidence par Sachs et Lang (1957) dans le cas du méristème apical de Jusquiam. Les mêmes effets ont été observés à propos du méristème de Rudbeckia bicolor, en liaison avec la mise à fleur (Jacqmard, 1967 et 1968). Par contre Nitsch (1967) montre que l'acide gibbérellique à la concentration de 10^{-5} M, en présence d'AIA, est incapable de provoquer la prolifération de fragment de moelle de tabac ; mais, lorsque cette substance est appliquée précocement (2 premiers jours), l'action de la kinétine, donnée après ce traitement (en présence d'AIA), est fortement augmentée. La séquence inverse ne montre pas cet effet ; dans cette expérience, l'acide gibbérellique semble préparer l'action de la cytokinine (Nitsch, 1968). Sur des cellules de reins de foetus de rat, cultivées in vitro, l'acide gibbérellique n'a aucune action sur la division cellulaire ; notons toutefois que cette hormone stimule la mitose au niveau de l'épithélium des cornes utérines de rat lorsqu'elle est injectée (Bouton, 1969) . Ces résultats contradictoires indiquent que l'effet de cette substance dépend vraisemblablement de l'état des cellules au moment du traitement. Il peut paraître intéressant d'étudier l'action de cette hormone sur des cellules privilégiées de Begonia rex, pour lesquelles deux messages (mitotique et morphogénétique) pourraient être nécessaires. Les résultats de cette étude sont rapportés dans les lignes qui suivent .

2. Modalités d'action de l'acide gibbérellique .

a. Rôle de la concentration (tableau 43) .

L'acide gibbérellique donné pendant les premières 24 heures à la concentration de 10^{-5} M et 10^{-4} M, inhibe durablement la morphogénèse des bourgeons et des racines. Cet effet ne se manifeste pas à la concentration de 10^{-6} M, le seuil d'inhibition se

TABLEAU 43 - Action de l'acide gibbérellique donné au cours des premières 24 heures à différentes concentrations sur la néoformation de racines et de bourgeons à partir d'explantats foliaires de Begonia rex (observations après 5 semaines de culture) .

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons/ explantat	Intervalle de confiance de la moyenne	Nombre de racines/ explantat
Témoin traité par l'eau	12	8,0	+ - 1,6	2,8
Acide gibbérellique	10^{-4} M	0	-	0
"	10^{-5} M	0	-	0
"	5×10^{-6} M	1	+ - 0,6	0,2
"	10^{-6} M	5,6	+ - 1,0	2,2

situant entre 3 et 5×10^{-6} M. Une autre gibbérelline, la gibbérelline A_1 , a les mêmes effets. Après 3 mois de culture, on peut observer sur des explantats quelques mamelons non fonctionnels, ce qui indique que les mitoses au niveau des zones privilégiées ont pu s'établir. L'étude histologique confirmera cette observation macroscopique .

b. Influence de la durée du traitement .

C'est la concentration de 5×10^{-6} M qui a été choisie pour l'étude de l'influence de la durée du traitement. Les résultats sont résumés par la figure 1 de la planche LIV. Il apparaît qu'un contact très bref, de 5 minutes seulement, est capable de réduire de $3/4$ le nombre de bourgeons par explantat. 1 heure suffit pour annuler presque complètement la morphogenèse. Cette rapidité d'action ainsi que sa durabilité sont tout à fait remarquables et on s'est demandé si la substance ainsi ingérée était fixée immédiatement par les cellules privilégiées ou si, au contraire, un traitement par l'eau (trempage) pouvait annuler l'effet de l'acide gibbérellique .

c. Influence d'un traitement aqueux donné aussitôt après la mise en contact avec l'acide gibbérellique .

Le tableau 44 montre qu'un traitement aqueux suivant immédiatement l'application de l'acide gibbérellique est sans effet sur la restauration du bourgeonnement, ce qui pourrait indiquer une fixation rapide et énergique au niveau de structures cellulaires .

d. Influence du moment du traitement sur la néoformation de bourgeons (Bigot et Nitsch, 1968) .

Il a été montré précédemment (Chap. IV) que 5 jours au moins étaient nécessaires à la reprise de l'activité mitotique des cellules qui donnent naissance aux bourgeons. On s'est donc demandé si l'action inhibitrice de l'acide gibbérellique différait selon le stade physiologique atteint par ces cellules ; cette hormone a été appliquée à des moments variables après l'isolement des explantats. Cette expérience

TABLEAU 44 - Influence d'un lavage par l'eau (2 heures) effectué aussitôt après un traitement par l'acide gibbérellique à la concentration de 5.10^{-6} M (résultats relevés après 5 semaines).

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre de bourgeons / explantat	Intervalle de confiance de la moyenne	Nombre de racines / explantat	Nombre d'expl. avec bourgeons
Témoin traité par l'eau	12	15,9	+ 1,5 - 1,5	2,5	12
Acide gibbérellique seul pendant 30 min.	12	4,3	+ 1,5 - 1,5	1,3	12
id° suivi d'un lavage par l'eau	12	5,8	+ 1,3 - 1,3	2,6	12
Acide gibbérellique seul pendant 60 min.	11	3	+ 1,6 - 1,6	1	9
id° suivi d'un lavage par l'eau	12	3,3	+ 1,5 - 1,5	1	12
Acide gibberellique seul pendant 120 min.	12	0,8	+ 0,5 - 0,5	0,6	6
id° suivi d'un lavage par l'eau	12	1,6	+ 0,8 - 0,8	0,9	8

pourrait rendre possible la localisation dans le temps "d'un signal physiologique" qui déclenche la suite des réactions aboutissant à la stimulation de la mitose et à l'organogenèse de bourgeons .

Les expériences précédentes nous ont fait adopter une durée de traitement de 12 heures et une concentration de 5×10^{-6} M qui est à la limite de l'inhibition totale du bourgeonnement. Trois expériences comportant chacune 12 explantats ont été réalisées et le traitement a été appliqué 8 heures, 12 heures, 24 heures, 36 heures, 48 heures après la séparation des explantats . Les résultats sont exprimés par les figures 2 et 3 de la planche LIV et par la figure 1 de la planche LV. L'effet inhibiteur diminue au fur et à mesure que l'application est plus éloignée du moment de la séparation des explantats . La signification statistique de l'expérience a été jugée par la méthode de χ^2 corrigé de Yates. Vis-à-vis du traitement par l'eau, le traitement immédiat par l'acide gibbérellique est significatif à $P_{0,01}$, le traitement différé de 8 h à $P_{0,05}$ et le traitement différé de 12 h. à $P_{0,1}$. Vis-à-vis du traitement immédiat ou du traitement différé de 8 h., le traitement différé de 24 h est significatif à $P_{0,01}$. Notons qu'un traitement tardif après 8 jours ou 15 jours n'a plus d'action sur la morphogenèse ; il entraîne seulement une diminution de la vigueur. Si l'on juge de l'effet de l'acide gibbérellique en dénombrant les bourgeons, on constate toutefois que les explantats traités restent inhibés par rapport au témoin, même après 48 heures .

e. Conclusions

Dans le cas de Begonia rex, l'action inhibitrice de l'acide gibbérellique, à partir de la concentration 5×10^{-6} M, appliqué immédiatement après la séparation des explantats présente des caractères particuliers de rapidité (5 mn suffisent pour produire un effet important) et de durabilité (les explantats ne présentent aucune ébauche après 3 mois de culture). L'efficacité de l'acide gibbérellique dépend du

moment de l'application de cette substance. La séparation de l'explantat met en route une chaîne de réactions conduisant à l'organogenèse de bourgeons : ces résultats indiquent que cette nouvelle orientation du métabolisme est prise très tôt (après 24 ou 48 heures) dans certaines cellules épidermiques adjacentes à la cellule basale de certains poils glanduleux ; ceci confirme les observations exposées au chapitre IV selon lesquelles certaines d'entre elles commencent leur dédifférenciation très précocement. On pourrait alors penser que l'acide gibbérellique n'a plus "prise" sur ce phénomène lorsque certaines étapes métaboliques conduisant à la mitose ont été franchies. Autrement dit, l'acide gibbérellique empêcherait la réalisation d'un des premiers stades du rajeunissement cellulaire qui pourrait être, par exemple, la reprise de synthèse de certains ARN. Cette éventualité sera étudiée dans un paragraphe suivant. Signalons que plusieurs auteurs ont montré que l'acide gibbérellique donné d'une manière continue, inhibe soit la formation des bourgeons (Schraudolf et Reinert, avec Begonia rex, 1959 ; Marcelle, sur Bryophyllum, 1963 ; Murashige sur tissu de tabac, 1964 ; Reinert et Besemer, sur Begonia rex et endive, 1967 ; Nitsch et Nitsch sur tige de Plumbago, 1967 ; Schott et Schraudolf sur Begonia rex (AG donné seulement pendant les premières 24 heures), 1967 ; Doerschug sur hypocotyle de laitue, 1968 ; Besemer, sur racines et feuilles d'endive, 1969 ; Heide sur Begonia cheimantha, 1969 ; Wardell et Skoog sur tige de tabac, 1969), soit la formation de racines (Brian et Lowe, avec les tiges de pois, 1960 ; Fellenberg, 1969, avec les épicotyles de la même espèce). Murashige (1964) montre, d'autre part, que cet effet est durable et que le transfert de cultures de tissus de tabac sur un milieu neuf sans hormone ne restaure pas la caulogenèse ; enfin, l'application différée d'un traitement par l'acide gibbérellique est moins efficace dans l'inhibition de la rhizogenèse de tige de pois (Brian, 1960) ou de la caulogenèse de tiges de tabac (Wardell et Skoog, 1969) ; Heide (1969) montre que l'application après l'initiation des bourgeons néoformés est sans effet dans le cas de Begonia (x) cheimantha .

3. Réversion de l'effet de l'acide gibbérellique .

L'action primaire de l'acide gibbérellique dans l'inhibition du bourgeonnement n'est pas connu. Il était logique de tenter de réverser cet effet par des promoteurs de la caulogénèse, c'est-à-dire les cytokinines. Les résultats les plus intéressants que nous ayons obtenus sont regroupés dans les tableaux 45 et 46. Une application de benzylaminopurine à la concentration de 3×10^{-5} M faite 12 heures après un traitement par l'acide gibbérellique à la concentration de 3×10^{-6} M ne modifie pas l'effet inhibiteur de cette substance sur le bourgeonnement. Par contre, l'effet stimulant de la cytokinine est annulé par l'acide gibbérellique (tableau 45). Il faut en fait utiliser des concentrations plus élevées de benzylaminopurine (10^{-4} M) pour réverser complètement l'action suppressive de l'acide gibbérellique (10^{-5} M pendant les 8 premières heures) (tableau 47). Ces résultats ne sont pas contradictoires dans la mesure où les courbes d'action des 2 types de substances sont différentes. Ils montrent (tableau 47) que ces hormones pourraient agir sur l'initiation de processus métaboliques de même nature .

D'autres auteurs ont tenté de réverser l'action de l'acide gibbérellique. Schraudolf et Reinert (1959) observent que cette réversion peut être obtenue par l'acide 2 4-dichlorophenoxyacétique, non par la kinétine. Heide (1969) n'obtient aucune annulation de l'inhibition par la benzylaminopurine ou l'acide naphthalène-acétique avec Begonia (x) cheimantha, Chlyah (1969), par contre, note, in vitro et en application continue, une disparition de l'effet inhibiteur dû à l'acide gibbérellique 10^{-5} M, soit par le saccharose (3 %), soit par une cytokinine naturelle, la 6, γ - γ -diméthylaminopurine (10^{-5} M) sur des explantats de Begonia rex. Il en est de même dans les expériences de C. Nitsch (1967) sur Plumbago, en présence d'adénine, (10^{-3} M) et de kinétine (10^{-5} M). Par contre, les mêmes tentatives réalisées en présence "d'antigibbérel-lines" (retardants ou morphactine) n'ont donné aucun résultat (Heide, 1969 ; Besemer, 1969) .

TABLEAU 45 - Effet de traitements successifs par l'acide gibbérellique (3×10^{-6} M) et par la benzylaminopurine (3×10^{-5} M) sur la néoformation des bourgeons (les traitements sont donnés pendant 12 h. et aussitôt le prélèvement ; résultats relevés après 8 semaines) .

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre de bourgeons par explantats.	Intervalle de confiance de la moyenne
AG → 0	13	12	1,7	+ 0,7 - 0,7
AG → eau	12	12	2,7	+ 1,1 - 1,1
BA → eau	14	14	26,2	+ 8,2 - 8,2
eau → BA	12	12	52,2	+ 13,1 - 13,1
BA → AG	13	13	11,5	+ 2,5 - 2,5
AG → BA	12	10	4,8	+ 2,4 - 2,4
eau → eau	11	11	11,5	+ 1,7 - 1,7
Pas de traitement	13	13	11,7	+ 1,7 - 1,7

TABEAU 46 - Effet de traitements successifs par l'acide gibbérellique (à la concentration de 10⁻⁵ M) et par la benzylaminopurine (à la concentration de 10⁻⁴ M) sur la néoformation des bourgeons (traitements donnés aussitôt le prélèvement ; résultats relevés après 8 semaines) .

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre de bourgeons/ explantat	Intervalle de confiance de la moyenne
Eau (24 h)	11	11	11,7	+ 1,7 - 1,7
BAP (24 h)	11	11	41,4	+ 10,5 - 10,5
AG (8 H)	12	0	0	-
AG (24 h)	12	0	0	-
AG (8 h) → BAP (16h)	14	14	40,5 ^(a)	+ 7,0 - 7,0

(a) Croissance réduite des ébauches .

En conclusion, dans les conditions de nos expériences, on peut dire que certaines étapes précoces, indispensables à la réactivation des zones privilégiées, sont "supprimées" par l'acide gibbérellique. Ceci est bien en accord avec les résultats précédents concernant des traitements différés. L'annulation de l'effet de l'acide gibbérellique a pu être obtenu cependant en diminuant la durée du traitement (8 heures) et en le faisant suivre par une application plus longue (16 heures) de cytokinine à une concentration supérieure (10^{-4} M). Notons cependant que, si le nombre des bourgeons est normal, leur croissance se trouve fortement réduite, les feuilles étant souvent déformées. Ces différents résultats nous ont incité à réaliser une étude histologique succincte après 5 semaines de culture, l'acide gibbérellique étant donnée à la concentration de 10^{-5} M pendant les premières 24 heures. Il est en effet important de savoir si cette substance a totalement inhibé l'activité mitotique au niveau des cellules privilégiées qui sont à l'origine des bourgeons .

4. Effets histologiques de l'acide gibbérelliques observés après 5 semaines de culture .

Les observations ont porté sur environ 500 zones privilégiées d'initiation : 7,4 % seulement d'entre elles se sont divisées 1 ou 2 fois et 3,8 % ont constitué un petit massif méristématiques (Pl. LV). Il apparaît donc clairement que l'acide gibbérellique donné au cours des premières 24 heures inhibe presque complètement la reprise d'activité mitotique des zones privilégiées d'initiation. Il faut ajouter les remarques suivantes :

a. La zone cicatricielle s'établit normalement : les réactions métaboliques déclenchées par la blessure annulent donc l'effet inhibiteur de l'acide gibbérellique sur la mitose. La zone cicatricielle, dépourvue d'amidon, diffère de nombreux trachéïdes .

Ce fait peut être intéressant, car il serait possible alors de séparer les mitoses conduisant à la cicatrisation de celles qui sont liées à la caulogénèse. Il se pourrait dans ces conditions qu'il y ait

un site spécifique d'action pour l'acide gibbérellique dans les cellules initiant les bourgeons, preuve supplémentaire de leur état particulier par rapport aux autres cellules .

b. Lorsqu'un mamelon méristématique s'est établi, il est en général peu développé : lorsque les cellules échappent à l'inhibition, l'acide gibbérellique ralentit considérablement le rythme mitotique. D'autre part, les divisions se produisent d'une manière anarchique et donnent naissance souvent à des expansions filiformes (Heide, 1969). La structuration du méristème conduisant à un fonctionnement plastochronique normal est abolie. Les cellules de ces mamelons n'ont pas gardé la plupart du temps leurs caractères méristématiques (diminution du rapport nucléo-plasmique, petit nucléole peu colorable par la pyronine, apparition du vacuome...) ; aucune mitose n'y est plus observable. Enfin, on note une forte accumulation d'amidon dans tout l'explantat ; les liaisons vasculaires entre les massifs méristématiques et la feuille mère ne sont pas différenciées .

c. Après 3 mois de culture, les mamelons peuvent donner des proliférations globuleuses non fonctionnelles comme le montre la figure de la planche LV. Un traitement par la benzylaminopurine empêche l'apparition de ces proliférations et provoque la formation de quelques bourgeons fonctionnels (Pl. LV, fig. 3).

En conclusion, il faut souligner que l'acide gibbérellique empêche le bourgeonnement en inhibant la reprise d'activité mitotique au niveau des cellules privilégiées ; son action est durable, contrairement à celle de la 2,6-diaminopurine. L'absence de structuration des méristèmes, lorsque ceux-ci parviennent à s'établir, est un phénomène secondaire, lié à la perte du pouvoir mitotique et à la différenciation rapide des cellules qui les constituent. L'hypothèse selon laquelle l'acide gibbérellique agirait sur les processus précoces conduisant à la différenciation des cellules privilégiées semble donc être confirmée par cette étude.

D - Effets de quelques autres substances .

1. Substances ayant des propriétés de cytokinines .

On a pu montrer (Bruce et Zwar, 1966) que les urées substituées ont certaines propriétés des cytokinines : maintien du taux des chlorophylles ou maintien de la capacité de synthétiser des protéines dans les feuilles détachées, promotion de la division cellulaire dans les cultures de cellules (Kefford et collab. , 1966). De telles substances (diphénylurée, N-3-chlor^Ophényl-N'-phénylurée, N-phényl-N'-2-pyridylurée, N-3-nitrophenyl-N'-phénylurée, phényl-5-quinolylurée) données pendant 24 heures à la concentration de 5×10^{-6} M et 5×10^{-5} M n'ont pas eu d'action sur la morphogenèse dans le cas du Begonia rex. Avec le diphénylurée, Brandes et Kende (1968) n'observent pas non plus de promotion du bourgeonnement dans le cas des mousses .

2. Morphactines .

Les effets d'une nouvelle catégorie de substances, dérivés chlorés du fluorène, nommés morphactines à cause de leur action morphologique, ont été rappelés dans une mise au point récente (Schneider, 1970). Ces composés, non toxiques, se dégradant rapidement, provoquent une narcose réversible de la division cellulaire dans le cas de méristèmes d'Allium cepa (Ringe et Von Denffer, 1967). Les plantes ou organes sont capables ensuite de reprendre leur croissance ou leur morphogenèse après une durée d'inhibition qui dépend de la concentration appliquée. Dans le cas de méristèmes caulinaires, ces substances induisent des morphoses végétatives ou florales (Begonia semperflorens : von Denffer, Ringe et Frich, 1969 ; Begonia rex : Schott et Schraudolf, 1967). Dans la plupart des cas, les plantes restent naines et acquièrent un port buissonnant .

Le tableau 47 indique les résultats de l'action du N-butyl-9-hydroxy-fluorène carboxylate (fluoronol-N-butylester), donné pendant les premières 24 heures à des concentrations variant de 10^{-8} M à 10^{-5} M ; après 5 semaines de culture, on note que :

TABLEAU 47 - Action d'une morphactine (fluorenol-N-butylester) sur la néoformation d'organes à partir d'explantats foliaires de Begonia rex (résultats recensés après 5 semaines ; traitements effectués pendant les premières 24 heures) .

Traitements	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats avec bourgeons	Nombre d'explantats montrant un trouble de la polarité du bourgeonnement	Nombre de bourgeons/ explantat	Nombre de racines/ explantat
Témoin	12	12	0	9,8 + 1,1	3
Morphactine 10^{-5} M	10	9	7	4 + 1,3	0
" 5×10^{-6} M	11	11	4	2 + 0,7	0
" 10^{-6} M	11	11	8	4,6 + 1,6	0
" 5×10^{-7} M	13	13	1	4,7 + 1,4	0
" 10^{-7} M	12	12	0	7,9 + 1,6	1,6
" 10^{-8} M	10	10	0	7,7 + 1,6	3,3

a. Cette morphactine inhibe complètement la rhizogenèse et, partiellement, la caulogenèse à partir de la concentration 5×10^{-7} M .

b. La polarité est annulée à partir de la concentration 10^{-6} M .

c. Cette substance provoque une importante perturbation dans le fonctionnement plastochronique du méristème : formation à partir de la concentration 5×10^{-7} M d'une collerette foliacée remplaçant les feuilles normales ou formation de feuilles en ~~enton~~tonnoir dont la croissance est très ralentie (Pl. LVI, fig. 2). Lorsque les explantats sont conservés pendant plus de trois mois, on constate que les méristèmes principaux sont toujours inhibés ; les méristèmes axillaires des deux ou trois feuilles formées ont commencé leur croissance, donnant aux bourgeons un aspect buissonnant (Pl. LVI, fig. 2 et 5). Il apparaît que les feuilles produites par ceux-ci sont également anormales : le trouble de la morphogenèse s'est donc transmis à ces méristèmes ce qui indiqueraient une très lente dégradation de la substance. Les bourgeons ainsi obtenus ne produisent pas de racine et les jeunes plantes meurent ; la base des points caulinaires devient fréquemment globuleuse, presque tubérisée ; cette observation est en accord avec la stimulation de la formation de cals à partir de l'hypocotyle de Phaseolus (Schneider, 1970) et de tige de Vitis vinifera (Julliard, 1968), ou la stimulation d'épaississement localisé au niveau de l'insertion des bourgeons axillaires de pommier (Schneider, 1970). On notera que Besemer (1969) a pu réverser l'action inhibitrice de l'acide gibbérellique par la morphactine (que certains considèrent comme une antigibbérelline). De nombreux auteurs (Schneider, 1970) rapportent enfin que cette catégorie de substances peut stimuler la croissance de primordia racinaires, mais s'oppose à leur organisation ou à leur croissance .

Nous avons remarqué que les feuilles anormales, formées au niveau de bourgeons dont le fonctionnement est altéré, sont capables de donner naissance à des plantes normales : il y a donc élimination progressive

de l'action morphogénétique de la substance. Des observations histologiques (Pl. LVI, fig. 3 et 4) indiquent que les cellules apicales des bourgeons anormaux conservent leurs caractères méristématiques, contrairement à ce qui a été décrit à propos de l'action de l'acide gibbérellique .

3. Acide abscissique .

L'effet de l'acide abscissique est rapportée pour la première fois par Heide (1968), à propos du Begonia (x) cheimantha Everett ; cette substance, donnée en pulvérisation à la concentration de 0,6 ppm a augmenté significativement le nombre de bourgeons formés par des fragments foliaires, remplaçant l'action stimulatrice des jours courts par cette espèce. Appliqué pendant les premières 24 heures, à des concentrations variant de 10^{-4} M à 10^{-6} M, l'acide abscissique n'a eu aucun effet sur la naissance de bourgeons et de racines à partir de fragments foliaires du clone de Begonia rex employé ici .

4. Retardants .

Il y a une vingtaine d'années, l'attention fut attirée par un nouveau groupe de substances, de nature chimique très différente, dont le point commun était de réduire la croissance en longueur des plantes sans altérer leur morphologie, ni le fonctionnement apical (port en rosette, feuilles normales). Lockhart (1962) proposa l'hypothèse que ces substances modifient spécifiquement l'activité des gibbérellines dans les tissus végétaux, sans préciser si elles entrent en compétition pour un même site d'action, ou si elles interfèrent avec leur synthèse, ou si elle inactivent directement les gibbérellines. Ninneman et collab. (1964) montrèrent que l'action de telles substances se porte vraisemblablement sur le métabolisme lié à la synthèse des gibbérellines, hypothèse confirmée par Harada et Lang (1965), qui indiquèrent que le CCC et l'AMO 1618 réduisent significativement l'apparition d'un précurseur, le kaurène ; Denis (1965) parvint à la même conclusion . Vis-à-vis de la division cellulaire, les retardants réduisent l'activité mitotique et le grandissement

cellulaire dans la zone subapicale, mais activent le fonctionnement cambial (Cathey, 1964). La rhizogenèse de boutures de chrysanthèmes peut être inhibée (Cathey, 1964); on notera qu'aucun résultat n'est relatif à l'initiation de bourgeons. Toutefois, C. Nitsch (1967) sur tige de Plumbago, Rancillac et Margara (1968) sur racine d'endive notèrent une stimulation de l'initiation à la floraison de bourgeons néoformés, sans donner de précisions vis-à-vis de l'intensité du bourgeonnement. En général, on note une persistance de l'effet retardateur de la croissance ; on a pu rapporter un passage de ces substances dans les graines formées sur les plantes traitées, dont la première génération a une croissance réduite (Cathey, 1964) .

Quatre substances produisant de tels effets (AMO 1618, B 995, CCC, Phosphon D) ont été essayées sur des explantats foliaires de Begonia rex, à des concentrations variant de 10^{-6} M à 10^{-4} M, appliquées pendant les premières 24 heures . Seul le phosphon D a eu un effet inhibiteur sur la morphogenèse .

E - Conclusions

Les expériences précédemment décrites, tout en confirmant les résultats obtenus par divers auteurs cités au cours du texte, apportent quelques éléments nouveaux. L'application de certaines substances pendant une brève période (24 heures ou moins), soit au moment du prélèvement, soit à des moments choisis (moments que l'étude histologique nous a permis de préciser), provoque une modification de l'aptitude à la néoformation d'ébauches de bourgeons sur les explantats foliaires de Begonia rex. Pour poursuivre notre étude, nous retiendrons les faits suivants :

1. Les cytokinines, en particulier la benzylaminopurine, stimulent le message morphogénétique. Leur action se porte d'une manière exclusive sur les cellules privilégiées qui donnent naissance aux points caulinaires ; il y a donc là un matériel d'un grand intérêt concernant les modalités d'intervention de ces substances sur le métabolisme cellulaire.

2. Une auxine, l'acide naphtalène acétique, en synergie avec la benzylaminopurine, peut renforcer l'effet de cette dernière ; le retard à la croissance observé après un traitement par les cytokinines est diminué par l'acide naphtalène acétique. Donnée seul, celui-ci inhibe la formation des bourgeons et stimule la formation des racines .

3. Une antipurine, la 2,6-diaminopurine, inhibe passagèrement la formation des bourgeons ; son action dépressive, réversée par l'adénine, s'élimine naturellement au cours du temps .

4. Une hormone végétale, l'acide gibbérellique, empêche l'induction mitotique au niveau des cellules privilégiées si elle est donnée aussitôt la séparation. A des concentrations assez élevées (10^{-4} M), cette action est réversée par la benzylaminopurine. Par contre, un traitement différé est moins efficace et un certain nombre de zones d'initiation "échappent" à l'effet inhibiteur de cette substance : l'induction au bourgeonnement pourrait être réalisée très rapidement après la séparation, pour certaines cellules privilégiées .

5. La morphactine, qui peut être considérée comme une antigibbérelline, trouble le fonctionnement plastochronique des méristèmes néoformés .

Le but de ces expériences était de déceler les substances organogénétiques susceptibles d'intervenir dans la formation des bourgeons chez Begonia rex ; vraisemblablement, les trois types d'hormones (cytokinines, auxines et gibbérellines), dont la présence a pu être détectée in vivo (Chapitre VI), jouent un rôle dans cette organogénèse. Toutefois, leur action conjuguée au moment de l'initiation mitotique n'est pas prouvée ; en particulier, il est possible que l'acide gibbérellique intervienne plus tardivement ; la réponse à ce problème ne pourrait être donnée que par l'étude systématique des variations relatives du taux des hormones au cours de la morphogénèse ; nous avons

vu les difficultés (hétérogénéité tissulaire, nécessité d'une quantité de matériel incompatible avec les possibilités de culture) pour aborder de telles expériences avec cette espèce végétale et les critiques qui pouvaient être faites à une telle étude (Chapitre VI) .

L'intérêt de cette expérimentation est aussi de procurer un modèle concernant l'action des hormones, modèle sur lequel on pourra intervenir par certains inhibiteurs du métabolisme, donnés par exemple d'une manière séquentielle. L'emploi des substances radioactives, dont la localisation pourra être précisée par l'autohistoradiographie, est une autre voie d'étude ; à cet égard, le Begonia rex constitue un bon matériel grâce à la localisation très précise des cellules donnant naissances aux bourgeons. Ces deux méthodes d'investigation seront utilisées dans la suite de notre travail. Rappelons que l'initiation mitotique nécessite un délai de 4 jours après l'isolement des explantats. L'un des événements discernables de cette réactivation est la duplication de l'ADN (phase S) dans les cellules privilégiées : après incorporation de thymidine tritiée, la méthode autohistoradiographique pourrait donc permettre de localiser dans le temps cet événement et de juger de l'impact ~~et~~ des hormones sur le moment de son apparition ; en second lieu, par l'action de certains inhibiteurs, nous tenterons de préciser le moment où l'information mitotique est donnée aux cellules privilégiées responsables de l'apparition des bourgeons .

III - EFFETS COMPARES DE LA 6-BENZYLAMINOPURINE, DE LA 2,6-DIAMINOPURINE ET DE L'ACIDE GIBBERELLIQUE SUR L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIEE AU NIVEAU DES ZONES PRIVILEGIEES D'INITIATION DE BOURGEONS EPIPHYLLES D'UN CLONE DE BEGONIA REX (Bigot et Hamon, 1970) .

A - Expériences préliminaire .

La localisation de la phase de duplication de l'ADN dans les

cellules privilégiées et l'action de ces trois substances sur l'initiation de cet événement ont été étudiées par la méthode d'autohistoradiographie. Les explantats traités par flottaison, sont mis en présence de la 6-benzylaminopurine (BA), de la 2,6-diaminopurine (DAP) et de l'acide gibbérellique (AG), à la concentration de 10^{-5} M, pendant le 1er jour suivant l'isolement. Un témoin traité par l'eau est mis en place dans les mêmes conditions. La thymidine tritiée, à la dose de $10 \mu\text{C}/\text{ml}$, en solution aqueuse stérile, est administrée par trempage de la section proximale des explantats au cours du 1er, 2ème, 3ème, 4ème ou 5ème jour après la séparation d'avec le reste de la plante mère. Les fragments sont ensuite fixés, coupés, mis sous émulsion suivant les méthodes déjà décrites. Des observations préliminaires ont été réalisées en prélevant seulement des lambeaux épidermiques sur les nervures des explantats traités et a donné les résultats décrits dans le tableau 48. Cette expérience indique que la méthode convenait à cette investigation. On notera la réactivation très précoce au niveau de la zone de cicatrisation, réactivation précédant l'apparition de la phase S dans les cellules privilégiées, phase qui est décelable au cours du 4ème jour pour le témoin et au cours du 3ème jour pour les fragments traités par la 6-benzylaminopurine. Malheureusement, le prélèvement de fragments épidermiques est difficile et irrégulier et ne permet pas une numération systématique comparative des zones privilégiées d'initiation activées ; ceci nous a obligé à étudier des échantillons entiers de fragments foliaires, étude dont les résultats quantitatifs sont exposés et discutés ci-dessous.

B - Résultats et discussions de l'expérience définitive .

La discussion immédiate des résultats nous a semblé inséparable de leur expression. Ces résultats, réunis dans le tableau 49 et illustrés par les planches LVII et LVIII doivent être considérés plus particulièrement sous un angle comparatif ; il faut rappeler en effet qu'il y a, pour le tritium, une forte autoabsorption qui limite la précision des évaluations quantitatives. Il nous a paru opportun auparavant de rappeler quelques faits :

TABEAU 48 - Détermination du moment d'apparition de la phase de duplication de l'ADN au niveau des cellules privilégiées initiant les bourgeons de Begonia rex (résultats préliminaires obtenus par prélèvement de fragments épidermiques ; benzylaminopurine donnée à la concentration de 10^{-5} M pendant le 1er jour ; thymidine tritiée donnée au cours du 1er, 2ème, 3ème, 4ème, 5ème jour, à la dose de $10\text{ }\mu\text{c/ml}$).

Intensité du marquage pour les fragments :										
Localisation du marquage nucléaire dans :	traités par l'eau					traités par la benzylaminopurine				
	1er jour	2ème jour	3ème jour	4ème jour	5ème jour	1er jour	2ème jour	3ème jour	4ème jour	5ème jour
la zone de cicatrisation	+	++	+++	++++	++++	+	++	+++	++++	++++
les cellules privilégiées initiant les bourgeons	0	0	0	++	-	0	0	+++	++	++++

L'incorporation de la thymidine tritiée dans les zones privilégiées d'initiation des bourgeons (Z, P. I.) - (application de la thymidine pendant 24 heures au cours du 1er, 3ème, 5ème ou 5ème jour - traitement par AG, DAP ou BA au cours des premières 24 heures suivant l'isolement des explants à la concentration de 10-5 M).

de 10-3 ml).																	
Traitement thymidine tritiée pendant le:																	
Traitement au cours du 1er jour par :																	

Les chiffres soulignés indiquent les résultats remarquables :

1. Introduction

Dans la cellule, on peut reconnaître deux catégories d'évènements :

- des évènements cycliques, comme la duplication de l'ADN, liée au maintien de l'aptitude à la mitose et sous contrôle génétique .
- des évènements continus, liés à ce qu'il est convenu d'appeler les métabolismes de régime .

Au cours de la différenciation, on observe d'**habitude** pour les cellules végétales, la perte de la première catégorie d'évènement ; les cellules sont alors fixées le plus souvent dans un état diploïde, quiescent, qui correspond à la phase G_1 du cycle mitotique. La reprise de l'activité de mitose nécessite un "inducteur", qui peut être, par exemple, un traumatisme. Dans ces conditions l'établissement du nouveau cycle mitotique semble exiger plusieurs facteurs ou ensembles de facteurs, dont l'apparition est séquentielle :

a. Tout d'abord, la cellule activée retrouve une capacité nouvelle pour la synthèse des acides ribonucléiques de toutes les catégories, ce qui implique un approvisionnement convenable en ribonucléotides et la présence de l'ARN-polymérase .

b. La duplication est ensuite rendue possible si la réduction des ribonucléotides et leurs phosphorylation s'effectuent normalement (réductase et kinases spécifiques), en particulier, la thymidylate synthétase (qui catalyse la transformation du dUMP en dTMP) doit être présente ; ce métabolisme est, bien entendu, lié à celui de l'énergie .

c. La phase S de synthèse de l'ADN nécessite un enzyme spécifique, l'ADN-polymérase, qui pour être fonctionnel doit être accompagné d'un facteur protéique .

d. Ce facteur protéique est synthétisé à la fin de la phase G_1 . Déjà, Jacob et Brenner en 1963 indiquèrent que le chromosome d'E. coli contient une région spécifique qui contrôle l'initiation de sa propre replication par l'intermédiaire d'un initiateur d'origine cytoplasmique. En 1967, Harris suggère aussi un contrôle cytoplasmique de la replication. Selon Larck (1969), la régulation de la replication de l'ADN est réalisée par 1 seul gène dans le phage Φ x 174, par 2 gènes dans le phage λ et par 20 gènes au moins dans le phage T_4 ; ces gènes n'ont pas pour fonction de coder pour les précurseurs de l'ADN ou pour l'ADN polymérase. La synthèse protéique est indispensable à l'initiation de la phase S du cycle mitotique, comme l'indique l'effet inhibiteur du chloramphenicol dans le cas des bactéries. D'autre part, la méthylation de l'ADN semble jouer un rôle important dans la reconnaissance du lieu de l'initiation de la replication par l'ADN-polymérase (l'ADN non méthylé est un mauvais modèle in vitro) ; on sait que ce phénomène est toujours polarisé. En résumé, les différents résultats suggèrent que l'initiation de la replication demande la synthèse préalable d'une protéine particulière, effectuée dans le cytoplasme, sous l'influence d'un message spécifique, produit par 1 ou plusieurs gènes. Ce facteur protéique a été partiellement isolé de cellules de mammifères par Erhan et collab. (1970) : il aurait pour rôle de structurer l'enzyme dans les trois dimensions et de reconnaître d'une manière spécifique la région d'initiation de la replication. Signalons toutefois que Ord (1969) ne parvient pas à mettre en évidence un tel facteur dans le cas d'Amoeba proteus .

e. D'autres protéines sont vraisemblablement nécessaires à l'achèvement du cycle mitotique : l'une pourrait être synthétisée à la fin de la phase G_2 ou au début de la prophase (Cummins, 1969), l'autre, au cours de la métaphase (Petersen et collab., 1969) . A la suite de leurs études, ces auteurs soulignèrent que la capacité d'une cellule à réaliser son cycle mitotique dépend d'une séquence rigide de

transcriptions et de traductions (c'est-à-dire d'une suite ordonnée de synthèses protéiques spécifiques) : toute interruption provoquée dans cette séquence empêche l'initiation d'un nouveau cycle mitotique . Il faut souligner que le Begonia rex pourrait constituer un matériel favorable à l'étude des processus de l'initiation mitotique par la localisation des cellules donnant naissance aux bourgeons .

2. Etude du témoin traité par l'eau .

L'incorporation de la thymidine tritiée (phase S) s'effectue au cours du 4ème jour (42 % des Z.P.I. marquées) dans les cellules épidermiques adjacentes à la base du poil glanduleux et d'une façon négligeable dans cette dernière (3,7 %), à l'exclusion des autres cellules épidermiques. Cette incorporation est suivie d'un nombre faible de reprises d'activité mitotique (16 % de Z.P.I.) le jour suivant. On peut raisonnablement penser que la durée de la phase G_2 prémitotique correspond à la 1ère mitose est égale ou supérieure à 24 heures. D'autre part, on constate que la reprise de mitose s'effectue dans une seule cellule adjacente dans 3/5 des cas ; l'expérience a montré que l'activité mitotique gagne ensuite les autres cellules adjacentes. On doit donc retenir qu'un laps de temps de 3 jours est nécessaire pour l'établissement des processus physiologiques conduisant à la reprise de la synthèse de l'ADN, donc à une nouvelle initiation des événements cycliques. Malheureusement au cours de la différenciation cellulaire, il est difficile de discerner lequel ou lesquels parmi les facteurs énumérés précédemment est ou sont réprimés, repression qui a entraîné l'arrêt de l'activité mitotique sur les feuilles en place. Il est important de souligner que l'état de répression des cellules privilégiées initiant les bourgeons est différent de celui des autres cellules épidermiques. Notre expérience montre en effet que les premières sont les seules à être activées par la séparation des explantats, après une période de latence de 3 jours (en dehors de la zone immédiatement adjacente à la blessure). On doit enfin observer que 20 % seulement des zones d'initia-

tion de bourgeons entrent en mitose au cinquième jour : 4/5 de ces régions restent donc inertes ou bloquées en phase G_2 ; ce fait doit être pris en considération du point de vue expérimental dans le cas où les inhibiteurs du métabolisme seront utilisés pour préciser certains événements se déroulant au cours des trois premiers jours : en effet, cette inertie fait que les cellules privilégiées ne sont pas dans un état métabolique les rendant sensibles à l'action de ces substances au moment du traitement.

3. Etude de l'effet de la 6-benzylaminopurine .

Cette substance, qui stimule vigoureusement le bourgeonnement, provoque une avance de 24 heures dans l'apparition de la phase S (61 % des Z.P.I. marquées contre 5 % pour le témoin le 3ème jour) exclusivement au niveau des cellules épidermiques entourant la cellule basale du poil glanduleux (7,2 % seulement parmi ces dernières incorporent la thymidine). Ces cellules sont donc dans un état privilégié quant à leur capacité de répondre à cette stimulation et constituent ainsi une population différente des autres cellules épidermiques comme cela a déjà été souligné. La comparaison des lignes 4 et 9 du tableau 49 indique que 21 % des cellules adjacentes marquées entrent en division après 1 jour contre 39 % pour le témoin : la phase prémitotique G_2 est donc vraisemblablement allongée dans un certain nombre de cas par rapport au témoin, ce qui explique la dépression observée dans le marquage au 4ème jour, au cours duquel de nombreuses cellules, en phase G_2 , n'incorporent plus la thymidine. Enfin la 6-benzylaminopurine entraîne au 5ème jour une accélération du rythme des mitoses par rapport au témoin. Après Bopp (1963), notons que Chapra et Rashid (1969) indiquent dans le cas d'une mousse que les cytokinines accélèrent l'initiation des bourgeons.

Les modifications provoquées dans le déroulement du cycle mitotique par les cytokinines ont été étudiées la plupart du temps sur des méristèmes racinaires : sur des racines d'oignon (Guttmann, (1956)

nota un raccourcissement de l'interphase et de la prophase et un allongement de la télophase après action de la kinétine et fit l'hypothèse que cette substance joue un rôle dans l'initiation du cycle mitotique ; McLeod (1968) obtint des résultats similaires avec les racines de Vicia faba et précisa que la phase G_2 précédant la prophase est plus longue que dans le témoin ; enfin, Van'Thof, sur racines de pois (1967-1968), situa l'action de la kinétine au niveau de la phase S comme catalyseur de la synthèse de l'ADN, les résultats étant obtenus après synchronisation du cycle mitotique par une carence en sucre. Les résultats que nous avons décrits sont donc en accord avec les précédents ; toutefois, s'appliquant à des cellules différenciées qui donnent spécifiquement des bourgeons, ils permettent une meilleure généralisation de l'action des cytokinines sur le cycle mitotique. L'action industrielle des cytokinines sur l'apparition de la phase S peut expliquer les observations de Patau, Das et Skoog (1957) et de Torrey (1961) concernant la stimulation de la polyploïdie : en effet, des cellules naturellement endomitotiques subissant l'action des cytokinines peuvent être conduites à une nouvelle replication avant l'induction mitotique, donnant naissance ainsi à des cellules filles tétraploïdes .

L'induction mitotique, toutefois, ne peut être produite par la kinétine seule, comme l'ont montré Das, Patau et Skoog en 1956 sur la moelle de tabac et comme l'ont retrouvé sur le même matériel, Nitsch et Nougarede (1967) : la régulation de l'activité mitotique est dépendante d'un équilibre entre cytokinine et auxine, cette dernière jouant un rôle vraisemblable dans la cytokinèse. Pour la moelle de tabac, l'application de kinétine pendant 24 ou 48 heures au début de culture est suffisante pour amorcer l'évènement cyclique mitotique, dont l'autoentretien nécessite seulement la présence d'une auxine pendant la durée de la culture (Nitsch et Bui Dang Ha, 1967). Il semble donc que la disparition du pouvoir mitotique au cours de la différenciation soit liée à la perte de plusieurs facteurs dont la synthèse est de nouveau permise par l'une ou l'autre de ces hormones. Les résultats de Jouanneau et Teyssandier

de la Serve (1970), obtenus à partir de suspensions cellulaires de tabac, apportent un élément nouveau : on peut obtenir la synchronisation partielle des divisions cellulaires par l'application séquentielle d'une auxine (2,4-D) pendant les premières 24 heures, puis de la kinétine ; l'ordre inverse est inefficace. Toutefois, 24 heures après la mise en culture, les deux substances sont toujours nécessaires, mais l'ordre de leur application est sans importance. Dans le cas de Begonia rex, deux faits doivent être rapprochés :

a. Au cours du 3ème jour après la séparation des explantats, on peut déceler une activité maximale des substances stimulant l'élongation du mésocotyle d'avoine (Chap. VI) .

b. La benzylaminopurine, employée seule, provoque une activation presque généralisée des zones d'initiation au cours du 3ème et 4ème jour et avance d'une journée par rapport au témoin la phase S de synthèse de l'ADN.

Il semble alors logique de penser que la limitation naturelle de l'initiation mitotique des zones de bourgeonnement puisse être liée à un déficit en substances de type cytokinine dans les fragments foliaires de Begonia rex .

Si l'action de la 6-benzylaminopurine est spécifique, on peut tenter de faire une hypothèse sur son point d'impact dans la cellule . Il faut d'abord remarquer que les cytokinines naturelles, en particulier la 6-diméthylallylaminopurine, constituent certaines des bases rares de certains ARN de transfert, toutes localisées habituellement près de l'anticodon ; ceci indique vraisemblablement un rôle dans une configuration stéréochimique indispensable à l'activité de la molécule ; par exemple, les t-ARN de la phénylalanine, de la leucine, de la sérine, de la tyrosine et du tryptophane chez Escherichia coli (Armstrong, 1969), de la sérine, tyrosine, cystéine dans la levure (Armstrong, 1969) contiennent une cytokinine ; on remarque que ces t-ARN traduisent les codons commençant par U ; par contre, aucun t-ARN traduisant les codons commençant par C, G ou A ne semble posséder de telles substances

dans leur molécule (Armstrong, 1969). L'incorporation de la cytokinine pourrait s'effectuer dans les chaînes ribonucléiques, ceci uniquement dans la fraction soluble d'après Fox (1966) : cet auteur suggère qu'elle remplace les bases méthylées, la faculté de méthylation pouvant être perdue au cours de la différenciation par certains tissus. Il a été montré en effet que les t-ARN qui manquent de bases méthylées ne peuvent former d'amino-acyl-t-ARN stables, ce qui perturbe ou annule la synthèse protéique. De fait, la stimulation ou le maintien du taux de synthèse protéique après action des cytokinines a été souligné par de nombreux auteurs. D'autres résultats mettent en évidence une augmentation de la formation de toutes les catégories d'ARN après un traitement par les cytokinines (Srivastava, sur feuille d'orge, 1967 ; Cherry, 1967 sur cotylédon de soja, Matthyse et Abrams, sur noyaux isolés de tabac ou de soja, 1970); de plus, sans que l'on puisse considérer qu'il s'agisse d'un effet primaire, on a pu noter l'inhibition de l'activité de la désoxyribonuclease et de la ribonucléase (Srivastava et Ware, 1965 sur la feuille d'orge ; Anderson et Rowan, 1966 sur la feuille de tabac) ou la stimulation de l'activité de l'adénine-phosphoribosyltransférase (Nicholls et Murray, 1968). Enfin des résultats récents de Matthyse et Abrams (1970) montrent l'existence probable d'une protéine adaptatrice (médiateur) qui permet in vitro la stimulation par la kinétine de la synthèse des ARN, en présence de l'ADN purifié de soja ou de pois comme modèle et de l'ARN-polymérase d'Escherichia coli.

En résumé, ces recherches, comme beaucoup d'autres que nous ne pouvons citer ici, mettent en évidence un effet stimulateur des cytokinines sur le métabolisme des acides ribonucléiques. Dans notre cas, l'augmentation précoce de la pyroninophylie après un traitement par la benzylaminopurine (Chap. VII, B) montre que l'effet de cette substance au niveau des cellules privilégiées est aussi de stimuler la synthèse des ARN. Avec la même cytokinine et par la même méthode histochimique, une observation identique est rapportée par Coddacioni et Usdati (1970) dans le bourgeon de Cicer. Une telle relation peut donc

expliquer l'apparition précoce de la phase de synthèse S de l'ADN dans les cellules privilégiées : en effet cette phase est précédée habituellement d'un net accroissement de la synthèse des ARN (Grippa, 1966 ; Key et collab., 1966). A notre avis, il est important aussi de noter que l'action de la 6-benzylaminopurine s'effectue spécifiquement au niveau des cellules privilégiées ; ceci implique pour elles un état particulier de réceptivité qu'il serait important de connaître. Toutefois, nous ne pouvons préciser sur quelle catégorie d'ARN porte l'effet stimulateur observé.

En conclusion, chez le Begonia rex, la 6-benzylaminopurine accélère l'apparition d'un évènement cyclique, la synthèse de l'ADN, qui est toujours suivie ici de la mitose. Elle permet ainsi l'expression des potentialités morphogénétiques conduisant à la structuration des méristèmes caulinaires .

4. Étude de l'effet de la 2,6-diaminopurine .

Cette substance, considérée comme une antipurine, peut entrer en compétition avec l'adénine au cours de la synthèse des nucléotides (Hitchings et Elion, 1963). Dans notre cas, elle retarde l'apparition de la phase S (10 % des Z. P. I. marquées contre 42 % pour le témoin au 4ème jour) ; pourtant, on note au cours du 5ème jour un pourcentage de Z. P. I. marquées comparable au témoin : dans ces conditions la phase G_2 du 1er cycle mitotique est très raccourcie . D'autre part, l'initiation de la mitose s'effectue dans un plus grand nombre de zones de bourgeonnement, ce qui confirme à cette substance un certain effet de cytokinine .

On peut donc dire que la 2,6-diaminopurine n'a donc pas troublé "l'information mitotique" . Rappelons qu'après un traitement par cette substance le fonctionnement du méristème est différé d'environ 4 semaines (Chap. VII, B). D'autre part, l'étude histologique nous a montré que les massifs méristématiques, après 5 semaines, n'ont pas

acquis la structure caractéristique d'un méristème caulinaire, contrairement au témoin. On peut alors considérer que cette substance modifiée momentanément "l'information morphogénétique" dont dépendra la mise en place d'un bourgeon fonctionnel.

A l'appui de cette hypothèse, il est bon de rapporter ici quelques résultats :

- Skoog et Tsui (1948) ont été les premiers à mettre en évidence le rôle de l'adénine (sous forme de riboside) dans le bourgeonnement, à partir de fragments de tiges de tabac, résultat confirmé par Jacquiot (tissu cambial d'Ulmus campestris, (1951) .

- Miller (1953) indique que la 2,6-diaminopurine inhibe la formation des bourgeons sur des segments de tiges de tabac, inhibition levée par l'adénine .

- Ginsburg (1966) note aussi une stimulation du bourgeonnement par l'adénine avec l'endive .

- Nitsch et collab. (1967) montrent que, parmi les bases puriques et pyrimidiques, seule l'adénine, incorporée dans le milieu, en présence d'une cytokinine à une concentration non stimulatrice, est capable d'initier des bourgeons sur tige de Plumbago ou sur fragments de moelle de tabac ; la 2,6-diaminopurine dans ce dernier cas à partir de la concentration 10^{-5} M annule l'action de l'adénine donnée à la concentration de 3×10^{-4} M. Les dérivés adényliques, tels que l'adénosine, déoxyadénosine, AMP, ADP, ATP, sont sans effet. Il en est de même d'une combinaison de l'adénine avec une autre base (sauf peut être avec la thymine) ou de la combinaison des bases entre-elles .

- Doerschug (1968) observe que la formation de bourgeons sur des cotylédons isolés de laitue est produite par l'adénine seule (5×10^{-4} M) ; La 2,6-diaminopurine inhibe cette action, mais son effet est réversé par l'adénine. Par contre, la kinétine ou la méthyladénine est inefficace dans cette réversion .

- Takatori (1968) provoque le bourgeonnement sur cal d'Asparagus par addition de sulfate d'adénine .

Ces résultats indiquent que parmi les bases puriques et pyrimidiques, seule l'adénine détermine, lorsqu'elle est présente pendant toute la durée de la culture, l'apparition de points caulinaires. Dans notre matériel, l'application de cette substance pendant les premières 24 heures est vraisemblablement trop courte pour stimuler la caulogénèse ; par contre, cette base purique réverse complètement l'action de la 2,6-diaminopurine. L'impossibilité d'annuler l'effet de cette dernière par une cytokinine montre que ces deux dérivés de l'adénine ont des points d'impact différents dans la cellule : l'une, la 2,6-diaminopurine peut se substituer à l'adénine, mais pas la cytokinine. L'effet synergique de la kinétine et de l'adénine dans le bourgeonnement ou l'effet de la kinétine seule (et peut-être des autres cytokinines) pourrait alors s'expliquer par une activation du métabolisme adénylique, dont dépendrait plus particulièrement l'initiation des bourgeons . Autrement dit, certains ARN spécifiques plus riches en adénine, pourraient avoir un rôle morphogène, par l'intermédiaire des protéines particulières, dans l'organisation d'une structure de type bourgeon . Cette hypothèse, faite avec la plus grande réserve, pourrait servir de base à une investigation plus poussée des catégories d'ARN apparaissant avant l'initiation des points caulinaires .

Il faut toutefois remarquer que la 2,6-diaminopurine produit aussi une inhibition marquée de la rhizogénèse (Torrey, 1956 ; Guillot, 1967) ; mais les concentrations ayant cet effet sont à peu près 10 fois supérieures à celles utilisées pour supprimer le bourgeonnement : ceci laisse supposer que le métabolisme lié au bourgeonnement est plus sensible à une perturbation du cycle de la synthèse des nucléotides adényliques que ne l'est le métabolisme lié à la rhizogénèse .

5. Etude de l'effet de l'acide gibbérellique .

Si les dérivés de l'adénine sont naturellement intégrés dans le métabolisme des acides nucléiques, et reconnus comme faisant partie effectivement de telles structures chimiques, il n'en est pas de même de l'acide gibbérellique (comme d'ailleurs des auxines), substances pour lesquelles aucune preuve formelle concernant une incorporation (in vivo) n'a encore été donnée. Comme le montre le tableau 49 l'acide gibbérellique réduit considérablement l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules privilégiées et supprime la 1ère mitose qui se situe au 5ème jour suivant l'isolement pour le témoin .

Les effets de l'acide gibbérellique sur l'initiation de la mitose ou de la synthèse des ARN sont souvent contradictoires, ce qui peut être attribué à l'hétérogénéité des états du matériel végétal au moment du traitement. Concernant l'action de cette hormone sur la mitose, deux catégories de résultats peuvent être décelées :

a. Stimulation des divisions cellulaires dans les apex caulinaires, soit plus particulièrement au niveau du méristèmes médullaire (Sachs et Lang, 1957 ; Bernier et collab. 1967), soit au niveau de tous les territoires méristématiques, comme l'observe Jacquemard dans le cas de Rudbeckia bicolor (1967, 1968). Selon cet auteur, l'acide gibbérellique pourrait contrôler le passage des cellules de la phase de présynthèse G_1 à la phase de synthèse S de l'ADN et peut être aussi le passage de la phase de postsynthèse G_2 à la mitose. Cette stimulation peut conduire à la mise à fleur .

b. Inhibition de l'activité mitotique (Nickell et Tulecke, 1959 ; Nitsch, 1967), entraînant une inhibition de la rhizogenèse (Brian et collab., 1960 ; Thurber, 1958 ; Kato, 1958) ou de la caulogenèse (Schraudolf, et Reinert, 1959 ; Murashige, 1964 ; Bigot et Nitsch, 1968 ; Doerschug, 1968 ; Besemer et collab., 1969 ; Wardell et Skoog, 1969) .

Dans le 1er cas (stimulation des mitoses), les cellules considérées au moment du traitement appartiennent à des méristèmes primaires en activité mitotique. Dans le second cas, il s'agit au contraire de cellules totalement différenciées ou en voie de différenciation, ayant perdu leur capacité de division. Autrement dit, l'action de l'acide gibbérellique est essentiellement différente suivant que les cellules sont ou non différenciées. Dans notre expérience, l'acide gibbérellique s'oppose au passage de la phase indéfiniment quiescente G_1 à la phase de synthèse S de l'ADN, c'est-à-dire au retour vers un état indifférencié, caractérisé en particulier par une reprise précoce de la synthèse des ARN ; ce fait est en contradiction avec les résultats de Ball et Joshi (1966) qui obtiennent un rajeunissement des cellules isolées de cals de tabac, en milieu liquide, par l'acide gibbérellique. Rappelons, dans notre cas, qu'un traitement différé par cette substance est moins inhibiteur et on a pu faire à ce sujet l'hypothèse qu'un certain nombre de zones d'initiation sont engagées très tôt dans la voie de la dédifférenciation d'une manière irréversible ; il serait donc intéressant de savoir si, après le traitement, une certaine catégorie d'ARN n'est pas spécifiquement inhibée par l'acide gibbérellique, qui pourrait se combiner avec une région particulière du matériel génétique. Pourtant, un grand nombre d'auteurs rapportent une stimulation de la production d'ARN par l'acide gibbérellique. Ainsi Broughton (1969) montre que le premier effet d'un traitement par l'acide gibbérellique est d'augmenter la synthèse des ARN et des protéines avant la division cellulaire ; Johri et Varner (1968) notent une augmentation de la synthèse des ARN après un traitement par cette substance chez des noyaux isolés de pois ; de la même façon, sur les noyaux de l'albumen liquide de coco, Roychoudhury et Sun (1965) indiquent une augmentation de l'incorporation du ^{32}P dans les ARN nucléaires et une stimulation de la "sortie" de ces ARN à partir du noyau, en présence d'acide gibbérellique à la concentration de 10^{-6} M. Enfin, Kamisa et collab. pensent que l'acide gibbérellique stimule, dans la levure, la production d'un ARN particulier en liaison avec la sporulation ? On sait d'autre part que cette hormone s'oppose à la

sénescence des feuilles (donc joue vraisemblablement un rôle dans le maintien de la synthèse protéique) dans le cas du Taraxacum (Fletcher et Osborne, 1965), du Nasturtium (Beevers, 1966) ou du Rumex (Harada, 1966 ; Goldthwaite et Laetsch, 1968). Cet effet est en relation avec une augmentation de l'incorporation de l'adénine marquée au ^{14}C dans les ARN (Fletcher, 1966). Nos résultats sont en désaccord avec ces observations ; il est apparu en effet que les zones privilégiées d'initiation restaient totalement inertes après un traitement par l'acide gibbérellique (Chap. VII, B). Toutefois il est intéressant de souligner que l'acide gibbérellique n'empêche pas l'incorporation de la thymidine tritiée dans la zone de cicatrisation : il y a donc ici une dualité d'action remarquable .

Nous avons recherché si l'inhibition de l'apparition de la phase S n'était pas due à une limitation de la transformation du dUMP en dTMP : un traitement simultané par l'acide gibbérellique (10^{-5} M) et la thymidine (10^{-4} M) pendant les premières 24 heures n'a pas conduit à un résultat différent de celui obtenu avec l'acide gibbérellique seul .

Dans un autre type d'expérience, nous avons étudié l'effet de la 6-benzylaminopurine (qui stimule la production des ARN) et de l'acide gibbérellique, données séparément pendant 24 heures au cours des 3 premiers jours , suivant le protocole décrit à la page suivante :

1er jour	2ème jour	3ème jour
Eau	néant	néant
Eau	néant	AG 10^{-5} M
Eau	néant	BA 10^{-5} M
BA 10^{-5} M	néant	néant
BA 10^{-5} M	AG 10^{-5} M	néant
BA 10^{-5} M	néant	AG 10^{-5} M
AG 10^{-5} M	néant	néant
AG 10^{-5} M	BA 10^{-5} M	néant
AG 10^{-5} M	BA 10^{-4} M	néant
AG 10^{-5} M	néant	BA 10^{-5} M
AG 10^{-5} M	néant	BA 10^{-4} M
AG + BA 10^{-5} M	néant	néant

Les résultats sont réunis dans la planche LIX

Il ressort clairement que :

a - L'action stimulatrice de la 6-benzylaminopurine (10^{-5} M) est affaiblie par un traitement par l'acide gibbérellique à la même concentration donné 1 ou 2 jours après .

b - Le traitement simultané ne lève pas l'inhibition de bourgeonnement dû à l'acide gibbérellique .

c - L'action inhibitrice de l'acide gibbérellique (10^{-5} M) est partiellement levée par un traitement par la 6-benzylaminopurine (10^{-5} M), totalement éliminée par la concentration 10^{-4} M donnée au cours du 2ème et 3ème jour .

d - Enfin, nous avons toujours observé un trouble du fonctionnement apical, que l'acide gibbérellique soit donné avant ou après le traitement par la 6-benzylaminopurine .

Par une méthode analogue, Nitsch (1968) a pu montrer que l'acide gibbérellique (10^{-5} M) seul ne permettait pas la division cellulaire dans le cas de la moelle de tabac, mais donnée avant la kinétine (10^{-6} M), se comportait en synergiste de la cytokinine ; donnée après, elle affaiblit l'action de celle-ci . L'acide gibbérellique dans ces conditions pourraient préparer à la mitose, la kinétine permettant ensuite l'expression de son action. Notre expérience ne permet pas une telle conclusion. En effet, avec notre matériel, l'acide gibbérellique exerce un effet inhibiteur sur les mitoses de cellules différenciées qui ont conservé naturellement cette aptitude ; si cette substance préparait à la mitose, nous devrions noter une stimulation du bourgeonnement après un traitement par une cytokinine donnée à faible concentration aussitôt après l'acide gibbérellique ; ceci n'a jamais été observé. Nous pensons comme plus vraisemblable que l'acide gibbérellique pendant les premières 24 heures s'oppose dans notre cas au phénomène de rajeunissement cellulaire lié à la dédifférenciation et que son action se porte plus particulièrement sur la synthèse des acides ribonucléiques précédant le 1er cycle mitotique. Dans ces conditions, la moindre efficacité d'un traitement différé de 24 ou 48 h (à la concentration de 3×10^{-6} M) pourrait être due à l'initiation irréversible et précoce d'effets spécifiques conduisant à la première mitose, ceci pour un certain nombre de zones privilégiées d'initiation . A des concentrations élevées (10^{-4} M), une cytokinine comme la benzylaminopurine est capable de rétablir cette synthèse en stimulant le bourgeonnement, ce qui est une caractéristique de son action .

C - Conclusion .

L'étude de l'initiation mitotique dans les 5 premiers jours suivant l'isolement et l'étude de l'effet précoce de quelques substances actives sur la différenciation des bourgeons nous permet de mieux localiser dans le temps une étape primordiale de la réactivation des cellules privilégiées, la synthèse de l'ADN, et de faire quelques hypothèses, ayant une portée plus générale, sur le mode d'action de certaines hormones ou sur l'initiation caulinaire .

1. L'apparition de la phase de duplication de l'ADN s'effectue au cours du 4ème jour (dans la région proximale du bourgeonnement) pour 2/5 des zones privilégiées ; elle est suivie d'une reprise de l'activité mitotique annonçant la formation de bourgeons pour 1/5 seulement de ces zones. Ce point étant acquis, il reste maintenant à rechercher les séquences métaboliques qui conduisent à la synthèse de l'ADN au cours des 3 premiers jours après la séparation .

2. La 6-benzylaminopurine initie le message mitotique : en effet, après une action de 24 heures, la phase de duplication de l'ADN est avancée d'un jour pour 60 % des zones d'initiation et s'effectue pour la totalité de ces zones au cours des 5 premiers jours . Cette substance stimule donc vigoureusement le métabolisme qui conduit à la reprise d'activité mitotique. Elle permet aussi de synchroniser partiellement la réactivation des zones privilégiées de bourgeonnement après la séparation des explantats .

3. La 2,6-diaminopurine trouble momentanément l'apparition de la phase S (retard d'une journée), mais, elle stimule l'induction du 1er cycle mitotique par rapport au témoin. Par contre, l'information morphogénétique menant à la structuration du méristème est ajournée de plusieurs semaines. On peut donc séparer, grâce à l'action précoce de cette substance les signaux contrôlant la division cellulaire de ceux qui règlent l'organogenèse. Appuyée par d'autres résultats, nous avons fait l'hypothèse que le bourgeonnement serait plus dépendant du métabolisme de l'adénine que la rhizogenèse (ARN morphogène plus riches en adénine ?). Un des effets des cytokinines pourraient être la stimulation de ce métabolisme .

4. L'acide gibbérellique empêche la duplication de l'ADN, donc la réalisation du premier cycle mitotique. Certains indices (cytochimie, réversion par une cytokinine), font penser que son action se porte sur la synthèse des acides ribonucléiques. Cette substance

s'opposerait donc au "rajeunissement" des cellules différenciées privilégiées qui sont à l'origine des bourgeons. L'action inhibitrice moins efficace de traitements différés indiquerait que certaines zones d'initiation sont très précocement engagées dans la voie du bourgeonnement d'une manière irréversible .

A la suite de cette étude, il reste à localiser avec plus de précision, au cours des trois premiers jours, certaines étapes métaboliques conduisant à la réactivation des cellules privilégiées ; les inhibiteurs du métabolisme peuvent nous être utiles pour résoudre ce problème ; ce sont les résultats obtenus par leur emploi que nous rapportons dans le paragraphe ci-dessous .

IV. DETERMINATION DU MOMENT DE L'INDUCTION AU BOURGEONNEMENT : EFFETS DE QUELQUES ANTIMETABOLITES .

A - Introduction .

L'emploi d'analogues des bases puriques et pyrimidiques ou l'emploi de certains antimétabolites permet de situer dans le temps un événement métabolique particulier ; leur activité inhibitrice n'est décelable que si la mise en contact s'effectue avant la synthèse des macromolécules indispensables, d'où la nécessité d'opérer par des applications séquentielles : par exemple, ces substances ainsi utilisées ont facilité la détermination d'un "point de non retour" dans l'initiation mitotique de cultures synchronisées de Chlorella pyrenoidosa (Woberg, 1968). L'expérimentateur dispose d'un grand nombre d'inhibiteurs du métabolisme (Bücher et Sies, 1969), dont quelques-uns sont indiqués dans la planche LX. Il était impossible de les utiliser tous pour notre étude. Dans le cas d'organes entiers ou de fragments d'organes, certaines difficultés de pénétration et de circulation, plus aisément résolus pour des bactéries ou des cellules isolées, peuvent apparaître. Il faut aussi envisager la toxicité

éventuelle de ces substances. Finalement, nous avons choisi des antimétabolites déjà éprouvés, que nous énumérons ci-dessous :

- 1 . la 5-bromodéoxyuridine (BUDR), analogue de la thymidine,
- 2 . le 5-bromouracil (BU), analogue de la thymine,
- 3 . la 5-fluorodéoxyuridine (FUDR), agissant après transformation en monophosphate, inhibiteur spécifique de la thymidylate-synthétase ,
- 4 . le déoxyadénosine (qui n'est pas un antimétabolite), inhibiteur de la synthèse des déoxyribonucléotides, donc de l'ADN (rétro-inhibition) .
- 5 . l'actinomycine D, inhibiteur de la fonction messagère dépendante de l'ADN,
- 6 . l'actidione (ou cycloheximide) et le chloramphénicol, inhibiteurs de la protéogenèse .

Parmi les analogues de l'adénine, l'action de la 2,6-diaminopurine ou de l'azaadénine a déjà été rapportée ; nous n'y ferons aucune allusion dans ce paragraphe .

Des expériences préliminaires nous ont montré que des traitements limités à 24 heures pendant les 5 premiers jours suivant l'isolement des explantats n'ont souvent donné aucun résultat. L'explication de ce manque d'efficacité nous est fourni par l'étude histologique précise que nous avons faite : en effet, 60 % des zones privilégiées d'initiation ne sont pas activées au cours des 5 premiers jours ; celles-ci ne sont donc pas "sensibles" à l'antimétabolite au moment du traitement. Ce dernier, par contre, agit sur les zones activées et les inhibe. Un "relai" est alors assuré, plus tardivement, par les régions restées inertes, qui entrent en mitose et masquent ainsi au moment de l'observation (après 5 semaines) l'action de l'antimétabolite. Il fallait donc généraliser et synchroniser les réponses des zones d'initiation de bourgeons pour obtenir un résultat clair sur la caulogenèse. Pour cela, nous avons utilisé la

propriété de la 6-benzylaminopurine, mise en évidence au paragraphe précédent, de stimuler le message mitotique dans toutes les cellules privilégiées (et seulement dans celles-ci) au cours du 3ème et 4ème jour suivant l'isolement. Les explantats ont donc été soumis à un traitement par cette substance, à la concentration de 10^{-5} M, au cours des premières 24 heures, et traités **par** les antimétabolites soit pendant ce premier jour, soit les jours suivants. C'est dans ces conditions expérimentales que nous avons pu suivre l'effet de ces inhibiteurs .

B - Effets des antimétabolites sur l'induction au bourgeonnement.

1. Effets de la 5-bromodéoxyuridine (BUDR)

La 5-bromodéoxyuridine (comme la 5-iododéoxyuridine) est incorporée dans l'ADN (racines d'oignon : Fucik et Kara, 1964). Elle entre en compétition avec la thymidine et la substitution peut être complète si l'on prend soin d'ajouter au milieu un inhibiteur de la thymidylate synthétase (Haut et Taylor, 1967). Après incorporation, elle peut empêcher le doublement de l'ADN en "effaçant" les repères chromosomiques nécessaires à l'initiation de la replication. Certains bactériophages (Sathl et collab., 1961) ou certaines cellules animales en division (Hamster : Chu, 1965) ayant incorporé la BUDR, montrent des lésions chromosomiques léthales si elles sont exposées à la lumière .

Dans notre matériel, l'utilisation de cette substance avait deux buts :

- a) vérifier les observations effectuées par l'incorporation de thymidine tritiée à propos de la localisation temporelle de la phase de synthèse de l'ADN,
- b) rechercher si d'autres cellules épidermiques étaient capables de se substituer aux cellules privilégiées (dont l'activité mitotique aurait été "bloquée" auparavant par la BUDR) pour l'établissement des bourgeons. Nous rappelons que les cellules épidermiques banales sont au moment du traitement en phase G_1 et n'incorporent pas la thymidine. Elles sont donc en principe insensibles à l'action de la BUDR .

Les explantats, après le traitement, ont été exposés à la lumière. Les résultats de cette expérience ont été réunis dans les figures 1 et 2 de la planche LXI et dans le tableau 50. Cette substance s'est montrée active à la fois pour les explantats témoins et pour les explantats ayant subi l'action préalable de la benzylaminopurine .

La BUDR à la concentration de 10^{-5} M est peu efficace sur le bourgeonnement au cours du 1er jour, moment où aucune incorporation de thymidine n'a été décelée précédemment, ce qui indique que la synthèse des déoxyribonucléotides n'a vraisemblablement pas commencée. Par contre, au moment où la duplication de l'ADN s'effectue (3ème et 4ème jour après l'isolement), le bourgeonnement est annulé ou considérablement affaibli du côté de la section proximale. Il est notable que l'inhibition de l'apparition des points caulinaires à ce niveau entraîne la néoformation de bourgeons du côté distal, c'est-à-dire, pour le témoin, une dépolarisation de la morphogenèse. Ce traitement produit en fait une véritable excision chimique des points caulinaires dominants et confirme les résultats rapportés au chapitre VI à propos des traitements chirurgicaux. L'absence de sensibilité des zones d'initiation distales à l'action de la BUDR peut être due soit à un retard dans l'apparition de la période de synthèse des nucléotides, soit à une rapide accumulation de la substance du côté proximal .

Nous avons voulu vérifier que :

- a. la BUDR pouvait être incorporée dans l'ADN,
- b. la BUDR n'inhibait pas la réalisation de la phase S précédant la première mitose .

Pour résoudre le premier point, nous avons donné au cours du 3ème et 4ème jour la BUDR à la concentration de 10^{-5} M en présence de thymidine à la concentration de 10^{-4} M. La figure 2 de la planche LXI montre qu'il y a réversion presque complète de l'effet inhibiteur de cet analogue et disparition de la dépolarisation pour le témoin. Pour donner

TABLEAU 50 - Action de la BUDR 10^{-5} M, donnée au cours du 3ème et 4ème jour suivant la séparation des explantats, sur l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules privilégiées d'initiation des bourgeons, après une stimulation préalable par la benzylaminopurine 10^{-5} M pendant le 1er jour (méthode autohistoradiographique telle qu'elle a été décrite préalablement ; Z. P. I. : zone privilégiée d'initiation ; observations faites du côté proximal) .

Traitements	Nombre de Z. P. I. observées	Nombre de Z. P. I. marquées	Nombre de Z. P. I. en division	Nombre de cellules épidermiques marquées	zone cicatricielle
BUDR et thymidine tritiée au cours du 3ème jour	171	94 soit 55 %	0	0	marquage
BUDR et thymidine tritiée au cours du 4ème jour	139	60 soit 42,8 %	0	0	marquage
BUDR le 3ème jour, puis thymidine tritiée le 7ème jour	182	26 soit 14,2 %	6 soit 3,2 % (1 seule division)	0	pas de marquage, ni de division, relai pris par d'autres cellules
BUDR le 4ème jour, puis thymidine tritiée le 7ème jour	173	54 soit 31,2 %	17 soit 10 %	0	id°

une réponse au deuxième point, l'incorporation de la thymidine tritiée a été suivie en présence de BUDR d'abord au cours du 3ème et 4ème jour, puis au cours du 7ème jour, après un traitement par cette substance effectué au 3ème et 4ème jour. Le tableau 50 réunit les observations qui confirment les résultats exposés dans le précédent paragraphe : la BUDR n'empêche pas la réalisation de la phase S ; mais, elle inhibe l'activité mitotique des cellules privilégiées ou la réduit. Il est notable d'autre part qu'aucune autre cellule épidermique n'incorpore (après 7 jours) la thymidine tritiée. On observe enfin que la BUDR a, de la même manière, inhibé les divisions des premières cellules réactivées de la zone cicatricielle, mais que celle-ci se reconstitue à partir d'autres cellules .

En conclusion, l'action séquentielle de la BUDR apporte certaines confirmations et des éléments nouveaux :

a. Le moment de l'initiation de la phase de synthèse S de l'ADN est confirmé par cette méthode : la duplication s'effectue bien au cours du 3ème et 4ème jour .

b. Aucune autre cellule épidermique n'est activée (au 7ème jour), lorsque les cellules privilégiées sont "bloquées" par la BUDR en phase S. Il apparaît donc que ces cellules détiennent seules la capacité d'exprimer l'aptitude génétique au bourgeonnement. Notre expérience ne permet pas toutefois de préciser le rôle du poil glanduleux dans l'induction au bourgeonnement .

c. L'excision chimique des zones proximales de bourgeonnement, obtenus par l'action de la BUDR, permet le développement des zones d'initiation situées du côté distal, c'est-à-dire une dépolarisation de la morphogenèse. Ce fait appuie l'hypothèse que la polarité très stricte du développement des bourgeons est due principalement à un phénomène d'inhibition par corrélation .

2. Effets du 5-bromouracile (BU)

Le 5-bromouracile, analogue de la thymine, doit être transformé en désoxyribonucléotide pour être incorporable dans l'ADN. Certains tissus ne possèdent vraisemblablement pas la capacité d'opérer cette conversion (Brockman et Anderson, 1963 ; Guillot, 1967) ; quand celle-ci est possible, l'incorporation dans l'ADN entraîne généralement une inhibition de la division cellulaire. Les résultats présentés dans la figure 3 de la planche LXI, ne sont pas assez clairs pour conclure nettement ; on peut observer une depression dans le bourgeonnement, plus importante à la concentration de 10^{-4} M si le traitement est effectué pendant le 2ème jour. Ceci pourrait signifier que la synthèse des nucléotides serait plus actives à cette période, en particulier celle du désoxyribonucléotide de la thymine. Toutefois, il se pourrait que cette substance ait une action plus complexe dans le métabolisme .

3. Effets de la 5-fluorodéoxyuridine (FUDR) .

Depuis les travaux de Cohen (1958), le 5-fluorouracile et son dérivé, la 5-fluorodéoxyuridine, sont considérés, à l'état^{de} monophosphate, comme des inhibiteurs spécifiques de la thymidylate-synthétase, qui catalyse la transformation de l'acide déoxyuridylique en acide thymidylique. De ce fait, la synthèse de l'ADN ne peut se poursuivre après épuisement du pool de l'acide thymidylique : c'est pourquoi son action inhibitrice très puissante sur la synthèse de l'ADN dans les racines de Vicia faba est réversée par la thymidine (Bell et Wolff, 1966). Cet antimétabolite n'est pas incorporé dans l'ADN .

Dans la figure 4 de la planche LXI, la FUDR à la concentration de 10^{-5} M ou 10^{-4} M est fortement inhibitrice de la caulogénèse, après une stimulation préalable par la benzylaminopurine. Elle est sans effet si ce dernier traitement n'est pas effectué. Toutefois, cette action est plus nette si l'application de la FUDR est faite au cours du

2ème jour ; ceci est comparable aux résultats obtenus avec la 5-BU et incite à penser que la synthèse de l'acide thymidylique s'effectue plus particulièrement au cours du 2ème jour dans les cellules privilégiées initiant les bourgeons .

4. Effets de la déoxyadénosine .

Ce métabolite inhibe la ribonucléotide-réductase par "feed-back", empêchant ainsi la synthèse des précurseurs de l'ADN (Larsson et Reichard, 1966 ; Nakata et Bader, 1969 ; Odmarck, 1969). L'action de ce composé peut être réversée en augmentant artificiellement le pool des déoxyribonucléotides par une application exogène chez Escherichia coli (Larsson, 1967). Remarquons que cette réversion est impossible dans le cas des racines de Vicia faba (Odmark, 1969). Chez le Begonia rex, ce composé n'a eu aucun effet sur le bourgeonnement lorsqu'il a été donné à la concentration de 10^{-5} M et 10^{-4} M au cours des trois premiers jours, avec ou sans stimulation préalable par la 6-benzylaminopurine. Cette inactivité pourrait être due soit à une métabolisation très rapide de la substance, soit à des difficultés de pénétration .

5. Effets de l'actinomycine D

Kirk montra pour la première fois en 1960 que l'actinomycine D inhibe la formation des ARN et plus particulièrement celle des ARN messagers. Depuis, de nombreux travaux indiquent que cette substance forme un complexe in vitro avec l'ADN , en s'insérant entre les 2 chaînes au niveau des résidus guanine, et provoque une distorsion de l'ensemble (Waring, 1968) ; cette modification stéréochimique empêcherait la progression normale de l'ADN-ARN polymérase, inhibant ainsi la synthèse des ARN messagers (Reich et collab., 1961), mais aussi celle des ARN de transfert (Merita, 1963) et peut être la synthèse de l'ADN (Reich, 1964). Dans les cellules de tabac, l'actinomycine D inhibe l'incorporation d'uridine tritiée et provoque une régression nucléolaire se traduisant en particulier par la disparition des vacuoles nucléolaires

(Morris-Johnson, 1969). On voit donc que l'action de cette substance pourrait ne pas être vraiment spécifique. On peut seulement dire qu'elle inhibe plus particulièrement la fonction messagère, dépendante de l'ADN. L'affinité particulière de l'actinomycine D pour la guanine permet de réverser son action si on incorpore dans le milieu de la déoxyguanosine, qui constitue un "leurre" fixant cette substance .

Avec le Begonia rex, l'actinomycine donnée à la concentration de 10^{-4} M s'est révélée plus inhibitrice du bourgeonnement si elle est donnée au cours du 2ème jour. Toutefois, cette action n'a pu être réversée par la déoxyguanosine (Pl. LXII, fig. 1). La synthèse de l'ADN est précédée et accompagnée d'une active production d'acides ribonucléiques de toutes les catégories et d'une augmentation de la synthèse protéique . Il se pourrait donc que certains ARN indispensables au bourgeonnement soient formés plus particulièrement au cours du 2ème jour : malheureusement, l'action de cette substance n'est pas spécifique et il est impossible de dire si l'inhibition porte sur des ARN messagers ayant une fonction dans le métabolisme général ou sur des ARN messagers "morphogènes", dont l'existence a été démontrée dans le cas des embryons de batraciens ou de poissons, ou dans le cas d'une algue, l'Acetabularia, par Brachet et collab. (1963, 1965) .

Enfin, remarquons que l'inhibition provoquée par cette substance reste incomplète ; son action peut être, en effet, perturbée par des ARN messagers à longue durée de vie, présents d'habitude chez les organismes supérieurs (Desveaux-Chabrol, 1965) .

6. Effets de deux inhibiteurs de la protéogenèse :
l'actidione (ou cycloheximide) et le chloramphénicol .

Le résultat obtenu par l'action de l'actinomycine D nous a incité à confirmer l'importance de la synthèse protéique au cours des premiers jours précédant l'induction au bourgeonnement. De très nombreuses substances ont été reconnues comme ayant un effet sur la protéogenèse

(Vasquez et Monro, 1967). Nous avons employé deux d'entre elles, plus communément étudiées et dont le mode d'action est mieux connu : l'actidione et le chloramphénicol .

L'actidione, qui n'a aucune action sur la protéogenèse dans le cas des bactéries, inhibe in vitro la synthèse protéique opérée par un système acellulaire, issue de mammifères (Ennis et Lubin, 1964) ou de levures (Siegel et Sisler, 1964b). L'annulation de la synthèse protéique entraîne celle des ARN et de l'ADN, cet effet dépressif apparaissant comme secondaire (Ennis et Lubin, 1964 ; Morris, 1967). La suppression de la substance entraîne une reprise de la protéogenèse dans le cas des systèmes cellulaires. Siegel et Sisler (1964a) d'une part, Ennis et Lubin (1964) d'autre part, montrent séparément que cette substance empêche le transfert des acides aminés liés au t-ARN, sur la chaîne polypeptidique en formation ; il en résulte un arrêt de la lecture du messenger et une accumulation de polyribosomes (Stanners, 1966). La spécificité de la cycloheximide vis-à-vis de l'inhibition de la protéogenèse chez les organismes supérieurs n'a pas encore été élucidée. Comme le montre la figure 2 de la planche LXII, l'action dépressive de cette substance est plus nette lorsqu'elle est donnée à la concentration de 10^{-5} M et 10^{-4} M au cours du 2ème et 3ème jour .

Le chloramphenicol, qui inhibe totalement et spécifiquement la protéogenèse chez les bactéries à des concentrations faibles de 1 à 10 mg/l, n'a pas d'effet dans ces conditions chez les végétaux supérieurs : il faut employer en effet des doses 1000 fois plus élevées pour obtenir une action dépressive notable ; ainsi, Kulaeva et Llyacko (1967) notent une faible réduction (10 à 20 %) de la synthèse des protéines après un traitement d'une heure par le chloramphénicol, à la concentration de 10 mg/l à 50 mg/l dans le cas d'explantats foliaires de tabac. L'arrêt total de la synthèse est obtenu par une solution contenant 2 g/l ; à cette concentration, il apparaît un effet toxique qui n'est plus lié à la seule inhibition de la protéogenèse (Ivanov, 1967). Dans ces conditions, il n'est guère possible d'interpréter

convenablement l'action de cette substance. Ce manque d'efficacité pourrait être dû soit à une mauvaise pénétration, soit à une métabolisation rapide de la substance (Lacharme et Netien, 1964). Il faut remarquer qu'une autre raison peut être invoquée : le chloramphénicol se fixe en effet d'une manière spécifique sur la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens, au niveau d'un seul site, mais il se montre incapable d'effectuer cette liaison avec la sous-unité 60 S de ribosomes issus du cytoplasme d'organismes supérieurs (Vasquez et Monro, 1964) ; par contre, cette substance inhibe la protéogenèse au niveau des chloroplastes isolés ou au niveau des ribosomes isolés de ces chloroplastes (Ellis, 1969), ribosomes dont la constitution est identique aux ribosomes bactériens (Eisenstadt et Branerman, 1964 ; Goffeau et Brachet, 1965). Il est donc tout à fait plausible que la configuration ribosomale empêche la fixation de cet antimétabolite dans le cas des organismes supérieurs, ce qui expliquerait son manque d'efficacité : dans ces conditions, à faible concentration, l'inhibition peu importante (10 à 20 %) de la protéogenèse dans le cas de fragments foliaires de tabac (Kulaeva, 1967) pourrait correspondre à la seule annulation de la synthèse protéique effectuée par les chloroplastes ou les organites analogues. Enfin, il se pourrait que des enzymes inductibles soient plus sensibles à l'action de cet antimétabolite (Sypherd et Strauss, 1963) .

Dans le cas du Begonia rex, le chloramphénicol donné à la concentration de 10^{-3} M au cours du 2ème et 3ème jour a eu une action dépressive sur le bourgeonnement, mais cette action a été moins nette que celle obtenue avec l'actidione donnée à une concentration 100 fois plus faible (10^{-5} M). Signalons que Syono (1965) a observé l'inhibition de la formation des bourgeons sur des tissus de carotte lorsque le chloramphénicol est appliqué pendant toute la durée de la culture à la concentration de 5×10^{-5} M, sans que la croissance des explantats ^{en} soit affectée .

Il semble donc que l'activité de protéogenèse nécessaire à l'établissement des bourgeons s'établisse après le 1er jour : les pertur-

bations métaboliques provoquées par l'actidione et le chloramphénicol sont également décelables au cours du 2ème et 3ème jour. L'absence de spécificité de ces antimétabolites ne permet pas malheureusement de conclure sur l'inhibition de protéines liées plus spécialement à l'organogénèse de bourgeons .

C - Conclusions .

Les résultats de l'action séquentielle des antimétabolites ont été réunis comparativement dans le tableau 51. Il semble que le "conditionnement" au bourgeonnement s'établisse plus particulièrement pour les cellules privilégiées au cours du 2ème jour et se poursuive au cours du 3ème jour après la séparation des explantats. On remarquera donc la précocité des réactivations métaboliques. Ce conditionnement pourrait dépendre de certains ARN, dont la spécificité reste à établir; synthétisés pendant le 2ème jour ; la reprise de l'activité de protéogénèse qui s'effectue à ce moment, est indispensable à l'expression du bourgeonnement, l'interruption du traitement par les antimétabolites ne rétablissant pas cette aptitude. D'autre part, la 5-bromodéoxyuridine a permis de montrer que seules les cellules privilégiées possèdent la capacité de former des bourgeons .

Il ne faut pas oublier toutefois que nous avons eu l'obligation de stimuler préalablement le bourgeonnement par une cytokinine, la 6-benzylaminopurine. Cette substance a pour effet d'accélérer le métabolisme conduisant à la replication de l'ADN dans les cellules privilégiées. Il est donc possible que d'une manière naturelle, les événements dont il a été fait état précédemment soient retardés d'une journée .

D'autre part, ces expériences ne nous permettent pas de séparer les signaux liés à la mitose et les signaux liés à l'organogénèse. Dans le Begonia rex, il se pourrait d'ailleurs que ces deux types d'information soient donnés au même moment .

TABEAU 51 - Action comparée de quelques antimétabolites sur l'inhibition de la caulogénèse chez *Begonia rex* (les signes + indiquent une action inhibitrice d'autant plus marquée que le nombre de signes est plus grand ; le signe 0 indique qu'aucune action n'est décelable ; le signe - indique que l'expérience n'a pas été réalisée) . Les explantats ont subi un traitement pendant le 1er jour par la 6-benzylaminopurine à la concentration de 10^{-5} M ; les observations sont faites après 5 semaines du côté proximal des explantats .

Nature de la substance	Moment du traitement			Nature de l'impact sur le métabolisme
	1er jour	2ème jour	3ème jour	
5-bromodéoxyuridine 10^{-5} M	+	-	++++	Inhibition de la mitose
5-bromouracile 10^{-5} M	++	++	-	Inhibition de la replication
5-bromouracile 10^{-4} M	+++	+++	-	id°
5-fluorodéoxyuridine 10^{-5} M	-	++++	+++	Inhibition de la thymidylate-synthetase
5-fluorodéoxyuridine 10^{-4} M	-	+++++	+++	id°
Déoxyadénosine 10^{-4} M et 10^{-5} M	0	0	0	Inhibition de la synthèse des déoxyribonucléotides
Actinomycine D 10^{-4} M	+++	++++	++	Inhibition de la synthèse des ARN messagers
Actidione 10^{-5} M	+	+++	+++	Inhibition de la protéogénèse
Actidione 10^{-4} M	++	++++	++++	id°
Chloramphenicol 10^{-4} M	-	0	0	id°
Chloramphenicol 10^{-3} M	-	++	++	id°

CHAPITRE VIII

DISCUSSION GENERALE

Les recherches rapportées précédemment avaient comme objectif de distinguer quelques facteurs contrôlant l'organogenèse de bourgeons. Pour ce faire, nous avons choisi des espèces végétales qui possèdent naturellement cette aptitude ; ce matériel en effet nous permet d'intervenir sur la caulogenèse d'une manière "négative", en empêchant l'initiation ou la structuration des méristèmes. Ceci peut constituer un avantage expérimental par rapport aux cultures de tissus, dont le bourgeonnement est le plus souvent provoqué. Parmi les organes végétaux possédant cette aptitude, les feuilles, qui ne sont pas en principe "déterminées" par une potentialité racinaire ou caulinaire, nous ont semblé constituer un matériel plus favorable à une telle recherche. Après avoir réalisé une étude histologique préliminaire, nous avons accumulé au cours d'expériences très diverses, de nombreux faits expérimentaux, dont certains nous ont conduit à faire quelques hypothèses. Il importe maintenant de les replacer dans un ensemble plus vaste ayant trait à l'organogenèse.

I - SPECIFICITE CELLULAIRE ET CAULOGENESE .

D'une manière générale, l'aptitude naturelle à la rhizogenèse est plus commune que l'aptitude naturelle à la caulogenèse ; le matériel foliaire n'échappe pas à cette règle comme l'indique les études d'Hagemann (1931). Notons qu'il est quelquefois difficile de juger exactement de l'aptitude à néoformer des bourgeons ; les auteurs omettent en effet, dans

le cas de tiges ou de rhizomes, de préciser si le bourgeonnement observé résulte du développement de bourgeons dormants (Dore, 1965). De ce point de vue, la situation pour les feuilles paraît assez claire, car les espèces possédant des méristèmes préformés ont été bien recensées : nous les avons écartées d'emblée, car la caulogenèse y était déjà induite. Notons enfin que l'aptitude à la caulogenèse peut disparaître avant la faculté de s'enraciner, comme le note Isbell avec les feuilles de tomate (1931), observation qui n'a pas été confirmée depuis à notre connaissance. Ce rappel pourrait laisser penser que la caulogenèse est tributaire de facteurs plus nombreux que la rhizogenèse .

A - Existe-t-il des espèces présentant une grande spécificité cellulaire vis-à-vis du bourgeonnement ?

En effet, la situation la plus favorable pour l'étude de l'induction du bourgeonnement est évidemment celle qui nous permet d'obtenir de telles néoformations à partir d'une cellule déterminée, facilement identifiable, dont nous pourrions suivre l'évolution métabolique dans les moments précédant l'organogenèse. D'un autre point de vue, l'intervention sur le bourgeonnement nécessite une connaissance exacte des modalités et des séquences de la néoformation des organes ; cette recherche histologique préparatoire nous a semblé indispensable, par exemple en vue d'une interprétation de l'effet des hormones ou des antimétabolites employés en traitement différé. C'est donc la question du choix du matériel végétal que nous posons maintenant. L'examen des nombreuses recherches morphologiques effectuées depuis des années renseigne d'une manière souvent confuse sur les modalités de la néoformation des bourgeons épiphylls ; dans la plupart des cas, les conditions du prélèvement des fragments foliaires et de leur survie ne sont pas précisées. Il a donc fallu reprendre, dans des conditions contrôlées, l'étude histologique exacte de la néoformation des bourgeons pour quelques espèces végétales choisies. Voici ce qu'il faut retenir de cette étude :

1. Chez Peperomia, une aptitude très précoce à la rhizogenèse se manifeste ; les bourgeons se localisent sur la base des racines néoformées et apparaissent tardivement (après une vingtaine de jours). Dans ces conditions, l'étude des facteurs de la caulogenèse est rendue très difficile, car toute intervention physique ou chimique aura d'abord un effet sur la néoformation racinaire .

2. Chez Lilium, les points de bourgeonnement s'organisent en faible nombre (2 à 3), et d'une façon imprécise, à partir d'un bourrelet méristématique (c'est sensiblement ce qu'on observe dans une culture de tissu). On doit noter cependant qu'une zone superficielle privilégiée pour l'organogenèse se situe au niveau des faisceaux conducteurs latéraux. Dans ces conditions l'étude fine de l'initiation est compromise, car rien n'indique qu'une cellule est plus à l'origine du bourgeon qu'une autre . De plus, l'écaille bulbaire a perdu l'aptitude à l'enracinement, alors que cette potentialité se manifeste très tôt à la base de la tige (racine tractrice). Nous étudions actuellement ce dernier phénomène qui met en défaut la liaison habituellement admise entre aptitude à la rhizogenèse et différenciation d'un cambium .

3. Chez Begonia rex, dans le cas d'un clône, l'étude approfondie a montré clairement que l'initiation des bourgeons s'effectuait exclusivement à partir de cellules épidermiques différenciées de l'épiderme supérieur situées immédiatement au contact d'un poil glanduleux. Celui-ci constitue ainsi un marqueur histologique précieux pour une étude moléculaire de l'initiation caulinaire. Ce matériel, conforme à la situation recherchée, a donc été adopté comme sujet principal d'étude. Cette particularité, déjà notée par Prévot (1948), est à notre connaissance unique pour les végétaux supérieurs. Seul pourra être **rapproché** le cas de certaines mousses pour lesquelles des cellules indifférenciées du protonema sont à l'origine de pousses feuillées (Brandes et Kende, 1968) .

B - Les tissus superficiels et particulièrement l'épiderme
sont-ils dépositaires de l'aptitude à bourgeonner ?

Les résultats de l'étude histologique précédente montrent que l'organogenèse des bourgeons s'effectue à partir de cellules superficielles (épidermiques ou non) aussi bien pour des fragments foliaires que pour des tissus racinaires néoformés. Il existe pour les feuilles d'autres exemples de ce fait, que la néoformation soit naturelle (Chouard, 1933 ; Buvat, 1950 ; Favard, 1963 ; Naylor et Johnson, 1937 ; Champagnat et collab., 1962) ou provoquée (Maheshwari, 1965 ; Nag et Johri, 1970). On peut donc se demander si, au cours de la différenciation, les facteurs contrôlant la caulogenèse ne se localisent pas particulièrement dans ces tissus.

Nous avons tenté de résoudre ce problème par des cultures en milieu aseptique : lorsque l'épiderme est décollé des fragments, le bourgeonnement s'annule et ne peut être restauré par des substances stimulatrices telles que les cytokinines ; des prélèvements internes de moelle de Begonia rex sont incapables de former des bourgeons ; des proliférations tissulaires obtenues après stimulation par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et comportant des lignées cellulaires d'origine épidermique restent très fortement caulogènes ; au contraire, si l'épiderme est supprimé avant la stimulation hormonale, les cals, peu vigoureux, ne forment pas de bourgeons. Ces quelques faits indiquent bien que la zone épidermique pourrait posséder seule l'aptitude à néoformer des bourgeons. Autrement dit, si l'on adopte le point de vue exprimé par Brachet concernant l'existence de gènes morphogènes (1965), il faut admettre que ceux-ci restent fonctionnels dans quelques cellules seulement pour ce clone de Begonia rex. Notons que certains cultivars de cette espèce ne montrent pas une spécificité cellulaire aussi stricte (Tran Thanh Van, 1970) ce qui en diminue considérablement l'intérêt. Notons enfin que des "zones" superficielles séparées comportant plusieurs assises cellulaires dont l'épiderme (Begonia rex, Prévot, 1968 ; Nautilocalix lynchii, Tran Thanh Van et Drira, 1970), sont capables d'exprimer leur aptitude

caulogène. Pour la seconde espèce, il serait même possible par un traitement approprié (auxine) de faire produire des racines par des cellules épidermiques ; ce matériel serait alors particulièrement intéressant dans l'hypothèse où les hormones, soit seules, soit en association, se comporteraient comme révélatrices des potentialités organo-formatrices : les deux catégories de "sites" organogènes y seraient donc restées "libres" de toute répression, bien que l'expression naturelle conduise au bourgeonnement. Nous pensons que l'épiderme est un matériel favorable pour l'investigation des facteurs endogènes contrôlant la caulogenèse à tel point qu'une poursuite des recherches peut être envisagée par d'autres méthodes (cellules séparées, protoplastes par exemple) .

C - Cellules de racines et cellules de tiges sont-elles différentes ?

Le cas de Peperomia introduit évidemment le problème de savoir comment naturellement une cellule de racine peut se transformer en une cellule de tige. Nous nous plaçons en dehors des cas où une prolifération cellulaire préalable a "rajeuni" les tissus et leur a fait perdre leur caractère initial . Un exemple analogue au nôtre est bien analysé par M. Champagnat, Marichal et Vincent (1962) sur les racines adventives de l'hypocotyle d'Alliaire : l'apparition des bourgeons s'effectue le plus communément très précocement à partir de la zone superficielle de l'ébauche racinaire. Dans notre discussion nous séparerons cellules méristématiques et cellules différenciées .

1. Cellules méristématiques .

Aucune expérience ne montre sans conteste la transformation d'un apex racinaire en apex de tige . Il est naturel ici d'analyser la seule tentative qui ait été faite pour obtenir une telle transformation, en utilisant des entre-nœuds de Cresson (Nasturtium officinale). M. Champagnat et Blatteron (1966) montrent l'origine superficielle des racines qui se différencient secondairement à partir de cellules sous-épidermiques situées à l'aisselle des feuilles. La plaque méristématique qui se constitue

avant l'initiation est polarisée : les cellules sont caulogènes du côté du pétiole et rhizogène du côté de la tige. On note que les ébauches de bourgeons apparaissent avant celles des racines. On rappellera qu'une situation un peu analogue existe dans le cas du germe de pomme de terre, mais à notre connaissance, l'ontogénie racinaire n'a pas été étudiée dans le détail pour ce matériel. On peut donc dire que les deux potentialités sont libres de se manifester à partir des cellules superficielles sous-épidermiques et que leur expression est soumise à un jeu complexe de corrélations internes (M. Champagnat, Ballade et Poste, 1967). Il est très important de souligner qu'au cours des premiers stades de l'organogenèse, l'épiderme de la tige recouvre l'ébauche racinaire et qu'il constituera, seulement tardivement, une sorte de coiffe, recouvrant le centre quiescent. Il a donc été tenté, par l'application de kinétine, de modifier le comportement organogénétique du méristème racinaire (Ballade, 1968). Après un tel traitement, il y a arrêt de la croissance racinaire et hypertrophie des assises externes ; la première manifestation cytologique qui va conduire à la formation de bourgeons s'effectue à partir des cellules épidermiques recouvrant l'ébauche racinaire : dédifférenciation cellulaire et reprise d'activité mitotique conduisent à la constitution d'une plaque méristématique non structurée se reliant au système conducteur de la racine, puis, à partir de cette plaque, se différencient plus tardivement quelques bourgeons. Lorsque l'ébauche racinaire comporte un centre quiescent et atteint plus de 700 microns, l'épiderme semble alors incapable de reprendre son activité caulogène. Il est clair, d'après cette expérience très intéressante, qu'on ne peut modifier la nature racinaire de l'apex par exemple en altérant le plan des divisions structurales par une hormone caulogène ; ce plan paraît donc "fixé". Tout au plus, on a **provoqué** un arrêt de fonctionnement et démasqué la réaction organogène du bourgeonnement épidermique (l'épiderme recouvrant ici la pointe racinaire). D'une manière générale, on notera que le fonctionnement caulinaire est beaucoup plus complexe que celui de la racine et fait appel vraisemblablement à un nombre supérieure d' "informations" morphogènes pour la réalisation de la forme spécifique (feuilles ou organes floraux). Ceci

pourrait être une raison de la moindre fréquence de l'aptitude à néoformer des bourgeons, la probabilité de perte de l'une de ces informations au cours de la différenciation devenant plus élevée. Il en résulte que le "programme racinaire" serait plus "universel" que le "programme caulinaire", car moins assujéti à des contraintes génétiques spécifiques (universalité structurale de la racine) .

2. Cellules différenciées .

Les cellules peuvent perdre au cours de leur différenciation certaines de leurs capacités. D'après ce qui a déjà été rapporté, l'aptitude à exprimer un caractère morphogénétique paraît plus liée à la position des cellules qu'à leur nature organique ; mais la question de savoir pourquoi les facteurs organogènes (tous présents à l'origine dans toutes les cellules) se localisent aussi strictement au cours de la différenciation reste pour l'instant sans réponse. Doit-on considérer que des cellules différenciées de tige ou de racines sont réellement différentes ? Les éléments pour résoudre un tel problème sont encore trop rares , comme le fait remarquer Guillot (1967) et il est impossible de conclure à ce sujet. Par exemple, on notera qu'au voisinage d'une blessure, l'épiderme de certains cultivars de Begonia rex est capable de former à la fois des poils absorbants et des bourgeons (Arnaud, 1970) .

En résumé, vis-à-vis de leur réaction organogène, rien ne permet de distinguer des cellules différenciées de racines ou de tige : pour l'une comme pour l'autre, des cellules méristématiques caulinaires s'établissent à partir de tissus superficiels et des cellules racinaires à partir de zones profondes périlibériennes .

D - L'aptitude à bourgeonner se maintient-elle au cours de la différenciation ?

On peut se demander si l'aptitude naturelle à la néoformation de bourgeon se démasque sur toutes les catégories d'organe pour une même espèce (en dehors de toute stimulation chimique). Par exemple, pour

l'endive, il a été montré que la capacité de bourgeonnement peut s'exprimer sur la racine sans apport exogène, mais une stimulation est nécessaire pour que le même phénomène se produise à partir des feuilles ou de la hampe florale. Dans le cas des organes d'origine foliaire, il est apparu que la potentialité de caulogénèse ne dépend pas d'un état de maturité ; elle se manifeste en effet sur les feuilles juvéniles ou les jeunes écailles bulbaires (sans stimulation) pour les trois espèces que nous avons étudiées. On voit donc qu'il existe là une certaine différence avec la rhizogénèse (à partir de tige), pour laquelle une certaine différenciation (liée à l'élongation) semble nécessaire (Moureau, 1940 ; Guillot, 1967). Avec le Lilium (x) "Echantment" nous avons approfondi cette investigation en recherchant comment évoluait l'aptitude à bourgeonner au cours de la séquence morphologique qui mène des écailles aux pièces florales. Sans stimulation par une association hormonale (auxine + cytokinine), cette aptitude est liée à l'état tubérisé (c'est-à-dire aux écailles et aux feuilles basales à gaine épaissie). On peut rétablir le bourgeonnement sur les feuilles de la tige (au moins partiellement) par l'application des hormones ; ceci est impossible pour les pièces florales. Il y a donc perte progressive de cette capacité au cours de la différenciation. A ce propos, pour la même espèce, nous avons noté aussi que la production des feuilles vertes par les ébauches néoformées est d'autant plus précoce que la feuille-mère est d'ordre plus élevé sur la tige. Autrement dit, il y a un "conditionnement morphogénétique" de ces ébauches par l'organe néoformateur. A notre point de vue, il y a là un fait expérimental très intéressant, allant dans le sens des hypothèses de Wardlaw (1965) et d'autres, qui admettent un déblocage en "cascade" de gènes morphogènes, dont le fonctionnement conduira de la feuille juvénile (cotylédon) aux pièces florales. La valeur foliaire de ces dernières est bien montrée, pour le Lilium étudié, par leur aptitude à axiller des bourgeons sur le réceptacle. Nous rapprocherons ici les faits décrits par Gay (1970) à propos de la régénération du gametophyte feuillé d'une mousse, le Polytrichum juniperinum : cet auteur note en effet que le pouvoir de régénération de filaments protonématiques secondaires à partir de fragments de tiges isolés décroît de la base vers

le sommet de l'axe, lorsque celui-ci est déplié, des bourgeons apparaissent directement sur les boutures, soit à la base si l'apex principal est présent, soit au sommet si on a procédé à une décapitation. Par contre, les feuilles ont perdu leur aptitude à régénérer directement des pousses feuillées ; elles produisent en effet d'abord un protome sur lequel se différencient plus tardivement des bourgeons .

En conclusion, au cours de la différenciation, certaines cellules particulières pourraient conserver une séquence génétique fonctionnelle contrôlant l'organogenèse de racines ou de bourgeons. Les informations ainsi produites sont utilisables soit immédiatement in situ (cas de la rhizogenèse en général ; cas du Begonia rex pour le bourgeonnement), soit dans un délai court (tissu indifférencié en culture, écailles de Lilium), soit plus tardivement (tissu "racinaire" de Peperomia ; épiderme "coiffé" des racines de cresson) .

II - CONDITIONS DE LA NEOFORMATION D'UNE STRUCTURE DE BOURGEON .

La néoformation d'un organe est un phénomène d'une grande complexité qui, à partir d'une cellule différenciée, est soumise à trois conditions :

A. Biochimique : replication de l'ADN qui n'est pas suivie obligatoirement d'activité mitotique .

B. Cytologique : apparition et autoentretien de la division cellulaire, ce qui implique un "réamorçage" continu pour lequel les corrélations inter-cellulaires peuvent jouer un rôle .

C. Morphogénétique : structuration du méristème ; il y a lieu à ce niveau de discuter l'hypothèse d'un organisateur spécifique, qui pourrait être liée directement à l'action hormonale. On notera que la production à

volonté de plantes à partir d'une cellule quelconque (expression de la totipotence cellulaire selon Steward) ne peut être envisagée que par la maîtrise complète des trois étapes citées. L'obtention de novo d'une structure embryonnaire (comme on peut l'observer à partir de cellules somatiques pour quelques ombellifères, ou à partir de cellules germinales mâles dans le cas du tabac ou du Datura) est l'objectif à atteindre .

A - Initiation de la replication .

1. En général, l'induction de la replication de l'ADN est obtenue après la séparation de la plante-mère ; nous sommes incapables de préciser actuellement si une substance particulière (inhibiteur) empêche cette replication (soumise à de nombreux contrôles génétiques comme nous l'avons déjà souligné) ou si des conditions trophiques défavorables (appels moléculaires dûs à l'apex ou aux jeunes feuilles) sont responsables de l'inhibition naturelle de la caulogenèse sur les feuilles en place. Toutefois quelques expériences (Chlyah-Arnason et Tran Thanh Van, 1968, ou observations personnelles non rapportées) indiquent que l'application exogène d'une cytokinine ou l'interruption chirurgicale du transit provoquent la néoformation d'ébauches caulinaires sur des feuilles restées en liaison avec la plante-mère ; on pourrait donc penser qu'un déficit hormonal ou trophique serait à l'origine de cette inhibition. En tout cas, l'initiation naturelle de la première réaction cellulaire ne peut être obtenue qu'après l'interruption des corrélations avec la plante-mère .

2. La blessure a un rôle très important dans l'activation des cellules privilégiées chez Begonia rex ; En effet, cette activation s'effectue seulement à proximité des zones traumatisées, sans polarisation. L'interruption des corrélations est donc insuffisante pour induire la replication au niveau de toutes les zones de bourgeonnement ; ceci n'est pas un argument en faveur d'un inhibiteur de la morphogenèse. On note d'autre part que la réaction de blessure est très rapide (quelques heures à 2 jours)

ceci a déjà été observé par Lipetz (1967), Yeomann (1968), Arnaud (1970), Lacharme et Steiman (1970) avec divers matériels. Cette réaction précède l'activation des cellules privilégiées, qui sont ici les seules parmi les cellules épidermiques à "répondre" à cette stimulation : quelque chose de particulier existe donc au niveau de ces cellules ; deux voies ont été alors envisagées pour les caractériser : cytologique et hormonale .

a. L'étude cytologique indique que le noyau de ces cellules est appliqué contre la membrane de la cellule basale du poil glanduleux dans 85 % des cas ; cette dernière a des caractères incontables de jeunesse : ceci laisse supposer qu'elle peut exercer un contrôle soit sur la mitose, soit sur l'organogenèse ; par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence ni dans le contenu en acides nucléiques, ni dans la répartition des protéines nucléaires basiques (en particulier, histones qui peuvent bloquer certains gènes) entre les cellules épidermiques banales et les cellules privilégiées au moment du prélèvement. Remarquons à ce propos que les méthodes histochimiques employées sont vraisemblablement trop grossières pour visualiser, en microscopie ordinaire, de faibles différences, très localisées dans le noyau ; malheureusement, le matériel se prête mal à une poursuite de l'étude en microscopie électronique .

b. L'application exogène d'hormones qui, on le sait, ont un effet sur la mitose et sur l'organogenèse, montre que leur rôle peut être pris en considération in situ. En effet, l'une d'entre elles, la benzylaminopurine (cytokinine) avance d'un jour et généralise l'initiation de la replication dans les cellules privilégiées, tout en étant incapable de stimuler cette réaction dans les autres cellules épidermiques. Il peut donc y avoir dans le végétal des cellules-cibles, dont l'état particulier prédispose à révéler l'action hormonale .

Par contre, l'acide gibbérellique a l'effet inverse : il empêche la replication dans les cellules privilégiées ; mais il n'inhibe pas la synthèse d'ADN au niveau de la zone cicatricielle, ni d'ailleurs la

mitose. Nous ferons dès maintenant la suggestion que les mitoses cicatricielles et les mitoses organogènes (à partir de cellules totalement différenciées) sont tributaires de facteurs différents. On sait que ces deux hormones sont capables d'agir sur la synthèse des ARN précédant la mitose, puis l'organogenèse (preuves histochimiques dans notre cas) ; c'est donc peut-être le processus métabolique qui est en jeu ici, la production de certains ARN particuliers indispensables à l'organogenèse étant soit activée, soit supprimée .

En conclusion, pour le Begonia rex, l'initiation de la replication dans les cellules privilégiées pourrait dépendre de 2 facteurs : l'un serait issu de la zone blessée, l'autre serait soit produit par la cellule basale des poils glanduleux , soit présent spécifiquement dans les cellules privilégiées. Une cytokinine pourrait jouer un rôle dans cette initiation. Notons que l'effet de la blessure dans le bourgeonnement a déjà été souligné par Nag et Johri (1970) .

B - L'initiation mitotique .

La replication n'est pas suffisante pour amorcer la mitose : ainsi, avec le Begonia rex, un peu moins de 50 % des zones d'initiation, commence la synthèse de l'ADN. La moitié d'entre elles seulement effectueront au moins un cycle mitotique. Remarquons que la cellule basale ne se divise pratiquement jamais : elle ne joue donc pas la rôle d'un "pace-maker" , c'est-à-dire le rôle d'une cellule qui entraîne une cellule voisine située à son contact à se synchroniser avec elle. En fait, l'activité mitotique débute dans une ou deux cellules contiguës au poil glanduleux, puis gagne les autres cellules qui occupent la même situation .

Dans cette initiation mitotique, les hormones jouent-elles un rôle ? Les arguments que nous avancerons pour justifier leur effet sont les suivants :

1. on peut mettre en évidence in vivo auxines et cytokinines dans les feuilles de Begonia .
2. les premières mitoses apparaissent au moment où le taux des hormones endogènes de type auxinique s'élève notablement aux deux pôles de l'explantat .

Or, l'on connaît le rôle de ces substances en synergie avec les cytokinines, sur la reprise d'activité mitotique dans de nombreux cas (molle de tabac en particulier). On remarquera toutefois que l'arrêt du transit des auxines par l'acide triiodobenzoïque n'affecte pas le bourgeonnement .

3. Les cytokinines données seules d'une manière exogène pendant 24 heures provoquent l'apparition de la 1ère mitose dans toutes les zones d'initiation situées du côté proximal et la synchronisation rapide des cellules activées .

4. on peut observer enfin l'effet synergique des auxines et des cytokinines données simultanément pendant les premières 24 heures après la replication .

Ces résultats suggèrent donc que les hormones jouent un rôle dans l'initiation mitotique, comme l'ont observé de nombreux auteurs .

Comment se maintient l'activité de division cellulaire ?

Nous constatons, chez Begonia rex, que de nombreuses zones s'arrêtent de fonctionner après quelques cycles ; seule une cytokinine, la benzylaminopurine, appliquée pendant une période limitée (8 heures à 24 heures) est capable de prolonger cette activité, le plus souvent jusqu'à la structuration du méristème. On remarquera toutefois que les glucides donnés pendant toute la durée de la culture sont capables d'accroître la capacité de bourgeonnement (Chlyah, 1969) .

Nous pensons que le maintien de cette activité est aussi dans l'explantat sous la dépendance de corrélations internes d'ordre trophique, analogue à celles que l'on peut déceler pour un rameau herbacé. En effet, nos expériences ont bien montré que les zones proximales de bourgeonnement (après 7 jours de séparation et avant la structuration) prennent rapidement la préséance et déterminent une inhibition par carence des zones distales : la suppression des premières provoque le développement des secondes. Cependant, celles-ci sont incapables d'empêcher la reconstitution de points de bourgeonnement dans la zone proximale . On peut donc dire que, d'une manière naturelle, l'aspect corrélatif du maintien de l'activité mitotique conduisant au bourgeonnement est particulièrement net dans le cas de Begonia rex. Il peut être vraisemblablement étendu à d'autres matériels .

C - L'organisation .

L'organisation d'une ébauche est une question fondamentale, qui a suscité nombre de réflexions et de théories, réunies par Sinnott en 1960 ou Wardlaw en 1965. Nous tenterons, dans les lignes qui suivent, de préciser notre apport vis-à-vis de ce stade de l'organogenèse .

1. La notion d'organisateur peut-elle être acceptée ?

Cette notion a été "cristallisée" par Bouillenne, il y a déjà de nombreuses années, sous le vocable de rhizocaline et de caulocaline. L'assimilation trop rapide (de la première) à une hormone végétale est sans doute trop primitive. Nous n'avons pour l'instant aucune preuve formelle de l'existence d'une telle substance (ou de plusieurs substances) jouant un tel rôle. Pourtant l'idée doit rester et peut facilement être étayée, à condition de considérer le problème d'une autre manière ; les arguments que nous donnons ci-dessous, nés de l'observation ou de l'expérimentation, nous semblent, en effet, favorables à l'existence d'une ou de plusieurs substances répondant à la notion d'organisateur :

a. Si un facteur particulier est lié à l'organisation d'une ébauche, il doit être transmissible par croisement et s'extérioriser dans la mesure où il est dominant ; ce résultat est rapporté par Prévot (1938) après diverses hybridations interspécifiques chez les Begonia (mais n'a pas été confirmé depuis) .

b. Il existe des mitoses organogènes et non organogènes. Par exemple, dans le cas de Begonia rex, certaines cellules épidermiques (qui ne sont pas au contact du poil glanduleux) se divisent tardivement en réaction à la constitution des mamelons caulinaires (dont l'augmentation de volume provoque un véritable effet traumatique sur les cellules voisines). Or, il n'y a jamais formation de bourgeons à partir de ces cellules. On peut donc dire qu'il se manifeste une aptitude cellulaire spécifique à l'organisation. Cette aptitude est confirmée par l'utilisation de la 5-bromo-déoxyuridine : un traitement exogène par cette analogue de la thymidine annule l'activation mitotique au niveau des cellules privilégiées ; on constate qu'aucune autre cellule (en phase quiescente au moment du traitement) n'est capable de prendre le relai pour le bourgeonnement .

c. Les deux types de mitoses peuvent ne pas être sensibles aux mêmes substances (acide gibbérellique, par exemple) .

d. Le caractère organogène peut rester en dépôt dans un tissu particulier (par exemple, l'épiderme ou l'assise sous-épidermique pour le bourgeonnement, les cellules périlibériennes pour l'enracinement). Si ces cellules sont supprimées mécaniquement, on ne peut faire réapparaître le caractère organogène dans un autre tissu. Ceci a été le cas de Begonia rex où , en particulier, des fragments pétiolaires sans épiderme ne peuvent bourgeonner même après action des cytokinines ; de la même façon, une culture de tissu ne comportant pas de lignées cellulaires d'origine épidermique ne forme pas de bourgeon .

e. Dans la naissance d'un méristème, la programmation des mitoses constitutives est tout à fait différente selon la nature de l'organe néoformé. On ne peut altérer cette programmation lorsqu'elle est en cours de

réalisation. Mais, une même cellule différenciée pourrait exprimer les deux programmes à la demande (cas de certains épidermes). On notera à ce propos que la morphogenèse est une réaction de tout ou rien : il n'y a pas en effet d'état intermédiaire entre racine et bourgeon .

f. L'organisation se démasque plus ou moins tôt : elle est donc "produite" .

Nous pensons que ces faits vont dans le sens de l'existence d'une ou de plusieurs substance(s) organisatrice(s) .

2. Quelle pourrait être la nature de l' "organisateur" ?

Il y a peu d'indication à ce sujet. Certains auteurs (Kahlem, 1970) rapportent la présence de protéines particulières liées à certaines étapes du cycle de développement et douées de propriétés immunologiques. Nous n'avons aucune preuve formelle pour l'instant de l'existence de protéines spécifiquement racinaires ou caulinaires. Toutefois, dans notre cas, l'emploi d'un analogue de l'adénine, la 2,6-diaminopurine nous permet de faire une hypothèse : cette substance, n'inhibe pas l'initiation de l'ADN (bien qu'elle provoque un retard d'une journée dans l'initiation de la replication), ni l'initiation mitotique (qui est même stimulée). Par contre elle diffère la structuration du méristème d'environ 4 semaines par rapport au témoin. Cet effet est totalement réversible par l'adénine ou s'élimine naturellement avec le temps ; les cytokinines sont sans effet sur le rétablissements du bourgeonnement .

Deux conclusions se dégagent alors de ces expériences :

a - le métabolisme de l'adénine est important pour l'organogenèse des bourgeons .

b - les cytokinines n'agissent pas directement dans le bourgeonnement .

Quel est alors leur mode d'action ? le paragraphe 3 ci-dessous sera consacré à la discussion de ce deuxième point .

Pour le premier point, les travaux montrant le rôle de l'adénine dans la caulogénèse sont nombreux et ont été rappelés dans ce travail. Il y a fréquemment un aspect synergique avec les cytokinines. La première hypothèse qui peut venir à l'esprit est un effet possible sur le métabolisme énergétique : une chute en ATP peut être décelée au moment de la division cellulaire (Wallis et Bradbeer, 1967). Toutefois, on sait qu'au moment de la mitose, la synthèse des ARN s'arrête : cette dépression du taux d'ATP peut être une conséquence de la mitose et non pas l'expression d'un besoin énergétique intense pour la réalisation du cycle mitotique. D'ailleurs, s'il y a une liaison avec le métabolisme de l'ATP, l'effet de l'adénine devrait se faire sentir aussi bien sur la rhizogénèse. Or, cette substance ne semble avoir aucune action sur celle-ci ; elle ne peut annuler l'effet inhibiteur de la 2,6-diaminopurine sur la formation des racines dans l'hypocotyle de tomate (Guillot, 1967). Notons d'autre part une observation déjà ancienne de Schmitz (1951) : dans les cals de tabac, le phosphore radioactif s'accumule spécifiquement dans les régions profondes d'initiation racinaire après un traitement auxinique, et dans les régions périphériques, zone d'initiation caulinaire, après un traitement par l'adénine. A notre connaissance, cette expérience n'a pas suscité de nouvelles recherches dans ce sens et pourrait être reprise avec le clone de Begonia rex étudié, l'étude étant facilitée par les cellules-cibles que nous avons bien caractérisées. Ce résultat va en tout cas dans le sens de notre argumentation : la caulogénèse est plus dépendante du métabolisme adénylique que la rhizogénèse. Comment interpréter ce fait ? Nous avançons l'hypothèse que l'apparition d'une structure de bourgeons serait liée à la synthèse d'ARN spécifiques plus riches en adénine, codant pour des protéines particulières, qui joueraient un rôle fondamental dans la répartition des mitoses. Cette hypothèse pourrait servir de fondement à une investigation plus fine des ARN nouveaux apparaissent avant et au moment de l'organisation des points de bourgeonnement.

3. Quel peut être le rôle des hormones dans l'organogénèse et, plus particulièrement celui des cytokinines dans le bourgeonnement ?

Les hormones ont sans conteste un effet dans l'organogenèse (messagers chimiques), mais leur modalité d'action est encore très mal connue. Il a été souligné plus haut que leur intervention pourrait être indirecte. Qu'apporte notre matériel à ce sujet ? Le fait le plus important est l'action stimulatrice spécifique d'une cytokinine, la benzylaminopurine (donnée pendant les premières 24 heures) sur les cellules-cibles aptes à donner naturellement des bourgeons ; Brandes et Kende (1968) ont rapporté un résultat analogue avec les mousses. Comment interpréter cette action ?

Chez les animaux, à propos de la différenciation, E. Wolff (1968) considère trois possibilités concernant l'effet des hormones :

1. L'hormone peut jouer un rôle d'inducteur par elle-même, soit en se combinant avec le matériel génétique, soit en agissant directement.
2. L'hormone peut se lier avec un effecteur particulier, présent dans le cytoplasme de certaines cellules seulement, pour donner une substance active par elle-même dans l'organogenèse.
3. L'hormone peut effectuer la même réaction, mais la substance ainsi obtenue a un effet de dérepresseur.

Remarquons que l'absence de "réponse" d'une lignée cellulaire à l'action hormonale impliquerait la perte du ou des sites au cours de la différenciation ou l'inactivation de ce(s) site(s) (dans les éventualités 1 et 3), par exemple par les histones ; à ce propos, on notera qu'aucune protéine basique nucléaire ne semble spécifique d'un tissu chez le pois ; on peut seulement mettre en évidence des différences quantitatives reproductibles pour plusieurs fractions (Fambrough, Fujimura et Bonner, 1968). Les exemples d'une probable intervention des hormones sur le génome sont nombreux, mieux connus dans le cas des bactéries ou des animaux, pour lesquels on peut déceler soit une action par microrégulation, qui indique la spécificité biologique de l'hormone (action sélective sur la transcription d'un m-ARN : Kenney, 1962 ;

Schimke, Sweeney et Berlin, 1965), soit une action par macrorégulation (action non spécifique par exemple sur la synthèse des r-ARN : Widnell et Tata, 1964 ; Tata, 1966). Pour les végétaux, des informations semblables, moins précises il est vrai, nous sont données à propos des effets de l'auxine (Nooden, 1968 ; Trewawas, 1968 ; Masuda et Kamisaka, 1969), des gibbérellines (Varner, 1964 ; Lang et Nitsan, 1967 ; Esnault, 1968 ; Broughton, 1969) ou des cytokinines (références dans le texte) .

Le fait qu'une cytokinine agit spécifiquement sur les cellules aptes à donner des bourgeons, le fait que les cytokinines sont incapables de provoquer la division cellulaire dans les zones rhizogènes périlibériennes, le fait que l'orientation de l'organogenèse peut être obtenue par l'action d'un messenger chimique hormonal dans le cas où une cellule posséderait les deux capacités morphogénétiques (épiderme de Nautilocalix lynchii par exemple) nous incitent à admettre que l'action hormonale dans l'organogenèse nécessite un facteur cellulaire particulier ; il y a d'ailleurs un argument expérimental dans ce sens pour les cytokinines : Matthyse et Abrams (1970) montrent la nécessité d'un facteur protéique (médiateur) pour une stimulation de la synthèse des ARN par la kinétine (ou la zéatine) dans un système acellulaire formé par la chromatine purifiée de pois et l'ARN- polymérase d'Escherichia coli . Un fait analogue est rapporté par le même auteur (Matthyse, 1970) à propos de l'auxine : une protéine, issue de bourgeon de pois, est plus efficace dans l'augmentation de la synthèse des ARN en présence de chromatine purifiée de bourgeons qu'en présence de chromatine issue de racines ; c'est l'inverse pour une protéine isolée de racines. La spécificité cellulaire de la réponse à une hormone pourrait donc résider, **au moins** en partie, dans la spécificité du facteur médiateur avec le génome . Lorsque ce facteur est inexistant, il y a impossibilité à obtenir la naissance ou la transformation d'un organe : ceci peut expliquer en particulier l'échec concernant la modification d'un apex racinaire en apex caulinaire. Toutefois, il faut remarquer que nous ne pouvons

éliminer totalement la première hypothèse (combinaison directe avec le génome).

L'action des cytokinines pourraient s'interpréter d'une autre manière : on sait en effet que ces substances occupent, dans la molécule de certains ARN de transfert, une position privilégiée (près de l'anticodon) ayant probablement une signification fonctionnelle. S'il existe des protéines racines et des protéines bourgeons (pouvant jouer le rôle de médiateur), peut-on penser que leur synthèse dépende d'un rapport particulier des espèces de t-ARN ou d'un rapport particulier de t-ARN isoaccepteurs, l'un d'entre eux ayant par exemple une cytokinine dans sa molécule ? Cette hypothèse ne doit pas être sous-estimée ; en effet, on note chez Eschérichia coli que la composition en amino-acides des protéines reflète l'abondance relative des t-ARN et que, par exemple, le leucyl-t-ARN comporte cinq formes, dont l'une représente 50 % de l'ensemble (Sueoka, 1970). Un changement dans l'abondance d'une espèce de t-ARN serait alors susceptible de modifier le taux de traduction d'un ARN messager. Toutefois, d'après nos connaissances actuelles, la composition en t-ARN pour les organes d'une même espèce ou pour des espèces différentes est sensiblement identique et ne permet pas dans ces conditions de soutenir l'hypothèse précédemment faite ; par exemple, dans le soja, on a mis en évidence six formes de leucyl-t-ARN dans les cotylédons et 4 seulement dans l'hypocotyle, mais on ne peut être assuré que ces différences ne sont pas dûes à une contamination par des ARN de transfert provenant des organites cellulaires à ADN. On observe de plus que la benzylaminopurine est capable d'augmenter la capacité de liaison avec la leucine pour deux formes d'ARN de transfert isoaccepteur de cet acide aminé dans ce matériel végétal (Anderson et Cherry, 1969). Ces faits toutefois ne nous semblent pas suffisants pour justifier un rôle particulier des ARN de transfert (contenant une molécule de cytokinine) dans l'orientation de l'organogenèse .

Dans le cas de Begonia rex, l'emploi de l'uridine tritiée ne nous a pas permis de déceler un enrichissement passager en ARN pour la cellule basale du poil glanduleux, accumulation qui aurait précédé l'activation des cellules contiguës. Dans ces conditions, nous ne pouvons décider si le facteur cellulaire dont nous parlons est produit par la cellule basale ou s'il est présent dans les cellules privilégiées. Il devient difficile alors de séparer induction mitotique et induction organogénétique. En particulier, les antimétabolites ou certains analogues ne permettent pas de distinguer les deux catégories d'information ; leur emploi autorise seulement à dire que le "conditionnement" au bourgeonnement s'effectue au cours du 2ème et 3ème jour après la séparation des explants ; l'activation est par conséquent presque immédiate. Dans d'autres cas, la stimulation au bourgeonnement par les cytokinines est beaucoup plus tardive par rapport à la stimulation mitotique, par exemple pour les cultures de tissu, mais on notera alors qu'il y a pas de cellules-cibles permettant de révéler sans délai l'action de l'hormone sur l'organogenèse : il est bon aussi de remarquer que dans ces cultures, l'organogenèse s'établit en général quand l'activité mitotique anarchique faiblit, ce qui est la preuve d'une modification métabolique profonde .

En conclusion, les faits expérimentaux paraissent renforcer plus particulièrement l'hypothèse d'une liaison entre les cytokinines et un facteur cellulaire spécifique, ensemble constituant alors un "signal" indispensable à la production d'ARN particuliers : la stimulation précoce de la production d'ARN après un traitement par la benzylaminopurine a bien été montrée dans notre matériel et dans d'autres (Usciati et collab., 1970). L'augmentation du bourgeonnement obtenu par l'adénine seule (à des concentrations assez fortes) ou en présence de cytokinine (à des concentrations faibles, Nitsch et collab., 1968) indique que ces ARN (morphogènes ?) pourraient être plus riches en cette base purique. On notera aussi que les cytokinines stimulent dans les cultures de soja l'activité de l'adénine-phosphoribosyl-transférase (Nichols et Muray, 1968) ; or cette enzyme permet à la base donnée de manière exogène d'être intégrée dans le métabolisme : l'un des effets des cytokinines pourrait être de favoriser naturellement le métabolisme adénylique, par induction enzymatique par exemple. On n'oubliera pas toutefois que l'adénine en tant que base ne se trouve pas à l'état libre dans les tissus végétaux .

En suivant ce raisonnement pour expliquer la diversité des résultats obtenus dans la stimulation du bourgeonnement, il est possible d'imaginer un faisceau d'hypothèses, présenté dans le tableau suivant ;

Agent de la stimulation du bourgeonnement	Situation dans la matériel végétal
Cytokinine seule	Pool adénylique suffisant, mais déficience naturelle en cytokinine .
Adénine seule	Richesse en cytokinine, mais pool adénylique insuffisant .
Les 2 substances à la fois	Insuffisance naturelle des 2 substances
Quelle que soit la substance appliquée, impossibilité de provoquer le bourgeonnement	Incapacité génétique par perte ou blocage du site de synthèse d'un organisateur (ARN plus riche en adénine) ou d'un système enzymatique lié au métabolisme de l'adénine .
Aucune substance n'est nécessaire	Organisateur préformé dans la cellule ou pool adénylique et taux de cytokinine d'un niveau suffisant pour l'initiation structurale .

4. A quel moment le message organogène peut-il être donné ?

L'acide gibbérellique inhibe les mitoses organogènes sans agir que les autres mitoses (cicatricielles ou autres). Donc, dans ces cellules, une réaction spécifique indispensable à la formation des bourgeons a été empêchée. Cet effet est réversé par la benzylaminopurine et l'étude histochimique révèle que le métabolisme des ARN est en jeu : il y a donc intervention sur le génome. Malheureusement, on ne peut séparer ainsi le message mitotique du message organogénétique : les antimétabolites ne nous sont pas non plus d'un grand secours pour résoudre ce problème, comme nous l'avons indiqué, Mais, l'action différée de l'acide gibbérellique apporte un élément nouveau : après 48 heures l'inhibition

de la caulogenèse est moins complète ; il s'est donc produit un événement irréversible et précoce dans certaines cellules privilégiées ; cet événement pourrait être la production du facteur cellulaire indispensable à l'organogenèse. De la même façon, la 2,6-diaminopurine, qui permet, si elle est donnée au cours des premières 24 heures, de différer l'organogenèse sans inhiber les mitoses, empêche le fonctionnement des bourgeons lorsqu'elle est appliquée au cours du 4ème jour. Il apparaît donc que l'induction à l'organogenèse peut être décelée très tôt ; cette induction semble particulièrement indispensable au cours du 4ème jour, qui est aussi le moment de l'initiation mitotique .

En conclusion, ces résultats nous montrent que, chez Begonia rex, information mitotique et information organogénétique sont liées dans les premiers stades de l'organogenèse, ce qui fait de cette espèce un matériel particulier. Seule, la 2,6-diaminopurine permet de séparer les 2 catégories de message, comme nous l'avons montré précédemment, et peut justifier l'hypothèse d'une séquence génétique guidant l'organogenèse .

5. Caulogenèse et polarité .

Un fragment foliaire présente une originalité par rapport à un fragment de racine ou de tige : on ne peut distinguer ^{un} pôle racinaire et un pôle caulinaire. Autrement dit, bourgeons et racines se développent à une même extrémité : le pôle proximal ou pétioleaire. Toutefois, nous avons été amené à séparer, à propos de Begonia rex, l'initiation des bourgeons de leur développement. Pour cette espèce, il n'y a pas de polarité d'initiation, mais seulement une polarité de développement ; cette dernière est déterminée par des inhibitions vraisemblablement d'ordre nutritionnel dans lesquelles la polarité de la conduction est à prendre en considération. Les zones de bourgeonnement proximales sont de ce fait stimulées et provoquent des appels moléculaires privilégiés vers elles ; il suffit en effet de supprimer ces zones chirurgicalement ou métaboliquement par la 5-bromodéoxyuridine pour stimuler au développement des initiums situés au pôle opposé . C'est donc la carence qui régit la polarité dans de tels fragments . Enfin,

remarquons que la théorie de Skoog, selon laquelle l'organogenèse est réglée par un équilibre relatif entre les hormones, nous oblige à prendre en considération une répartition différentielle radiale, sans aucun doute subtile, pour expliquer l'initiation au même pôle de racines et de bourgeons .

III - PEUT-ON CONCEVOIR UNE THEORIE DU BOURGEONNEMENT ?

L'étude analytique que nous avons faite nous a persuadé de la complexité des réactions menant à l'organogenèse. Elle a permis d'attirer l'attention sur quelques facteurs régissant la caulogenèse chez Begonia rex. En aucun cas, elle n'aurait la prétention de résoudre le problème de l'organogenèse de bourgeons. La plupart des recherches concernant le bourgeonnement a mené à des théories souvent exclusives, basées sur un petit nombre d'exemples, et qu'il est facile de mettre en défaut. Ainsi, tour à tour, il a été fait état soit du rôle privilégiée d'une seule hormone, l'auxine, dans le contrôle absolu de la morphogenèse, soit, d'une hormone hypothétique, la caulocaline, matérialisant l'idée d'organisateur, soit d'inhibitions spécifiques s'opposant, suivant leur nature et leur point d'accumulation, à l'action de substances stimulantes, soit de gradients hormonaux réciproques, liés à la polarité de la conduction, soit d'aptitudes cellulaires différentielles résultant de la répression génétique de certaines séquences du génome, soit de gradients nutritionnels .

A notre avis, tous ces facteurs sont susceptibles d'intervenir à la fois dans la caulogenèse (ou l'organogenèse en général). Seule, l'importance de chacun d'entre eux peut différer en fonction du matériel végétal considéré . Il nous semble vain dans ces conditions d'élaborer une théorie du bourgeonnement. Nous mettrons toutefois plus particulièrement l'accent sur la notion d'organisateur, notion qui nous paraît plus fondamentale. Ainsi, l'impossibilité d'obtenir des bourgeons à partir d'organes ou de cultures de tissu pour de nombreuses espèces pourrait être liée au manque actuel d'informations claires sur la nature

des substances (médiateur ou organisateur) qui interviennent dans la régulation de l'organogenèse. C'est la raison pour laquelle l'étude approfondie des cas qui possèdent l'aptitude à "organiser des bourgeons" prend une grande importance. En particulier, pour sortir de l'impasse théorique à laquelle nous conduit trop souvent l'étude de la stimulation de la morphogenèse par l'application exogène des hormones ou d'autres substances (ce qui ne signifie pas que cette étude soit inutile ; bien au contraire, elle a rendu de grands services en agronomie) il nous a semblé nécessaire de revenir à l'analyse in vivo des fondements du bourgeonnement pour un matériel particulier, le Begonia rex. Notre étude indique en résumé que plusieurs signaux successifs contrôlent l'initiation des bourgeons :

1. Le premier signal est lié à l'interruption des corrélations avec la plante-mère libérant ainsi les zones d'initiation de leur inhibition de développement.

2. Le second signal, provoqué par le traumatisme, concernerait plus particulièrement l'information mitotique. En effet, il est apparu que l'activation des zones d'initiation qui s'effectue sans polarité dans les régions proches de la blessure, est postérieure à l'apparition des mitoses annonçant la constitution de la zone cicatricielle.

3. Le troisième signal concerne l'organogenèse ; il ne peut être perçu que par certaines cellules de l'épiderme. Ces cellules sont dans un état particulier comme l'indique l'effet stimulant spécifique d'une cytokinine, la benzylaminopurine. On notera que la position de leur noyau fait penser à un contrôle de la morphogenèse par la cellule basale de poils glanduleux. D'autre part, l'effet de la 2,6-diaminopurine montré qu'un message organogène, tributaire du métabolisme de l'adénine, pourrait exister ; de ce fait, le bourgeonnement serait lié à la production d'ARN messagers morphogènes plus riches en adénine : l'un des effets des cytokinines serait alors de provoquer leur synthèse en se combinant (seules ou après réaction

avec un facteur cellulaire particulier) avec un site spécifique du génome. Ces substances pourraient aussi stimuler le métabolisme de l'adénine d'une manière privilégiée. Dans le matériel utilisé, le conditionnement au bourgeonnement s'effectue très rapidement, au cours du 2^{ème} et 3^{ème} jour après la séparation des explants ; l'activation mitotique et l'information organogénétique semblent contemporaines .

Nous pensons qu'au terme de ce travail, diverses voies de recherches s'ouvrent et méritent une investigation plus complète; nous énumérons ci-dessous celles qui nous paraissent les plus intéressantes :

- a. Etude des réactions dûes à la blessure, plus particulièrement vis-à-vis de l'initiation mitotique, de la synchronisation des mitoses et de la nature de la substances ou des substances provoquant une activation progressive des cellules .
- b. Mise en évidence de séquences génétiques liées à la caulogénèse, soit par l'interprétation de résultats de croisements, soit par la caractérisation d'ARN spécifiquement synthétisés avant ou au moment du bourgeonnement .
- c. Connaissance de facteur(s) cellulaire(s) localisé(s) pouvant servir de médiateur entre les hormones et le génome .
- d. Recherche du rôle des cytokinines dans le métabolisme de l'adénine en liaison avec la production de messagers organogènes ; en particulier, il est important d'étendre cette étude à des cellules séparées capables de différenciation et de maturation .

Dans le futur, l'étude de ces différents points nous semble susceptible d'accroître nos connaissances d'une manière très profitable pour la compréhension de l'organogénèse de bourgeons .

RESUME

Les recherches rapportées précédemment avaient pour but d'étudier quelques facteurs contrôlant l'organogenèse des bourgeons. On pouvait envisager deux voies d'investigations pour aborder une telle question : soit en provoquant l'induction de la néoformation d'organes par divers traitements (physiques ou chimiques), soit en analysant les facteurs intervenant dans l'initiation naturelle de bourgeons. C'est cette dernière méthode qui a été choisie et les espèces végétales qui possèdent la capacité de former des points caulinaires à partir de fragments foliaires nous ont semblé pouvoir constituer un matériel favorable .

Une étude préliminaire du mode de formation des bourgeons nous a permis de déterminer le matériel végétal le mieux adapté à cette analyse. L'étude histologique, dans la mesure où elle est réalisée d'une manière dynamique, constitue une étape préparatoire souvent indispensable à une étude physiologique approfondie. En effet, les méthodes qui font intervenir l'application séquentielle soit d'hormones, soit d'antimétabolites, nécessitent la connaissance précise de l'état de différenciation au moment du traitement ; lorsque cette analyse n'est pas faite, on ne peut, dans la plupart des cas, donner de conclusions fondées . Cette étude histologique nous a indiqué que la néoformation de bourgeons se réalisait différemment suivant les espèces végétales envisagées :

1 - chez Peperomia, les bourgeons se localisent sur la base des racines néoformées et la caulogenèse est de ce fait très dépendante de la rhizogenèse : l'étude du bourgeonnement est alors rendue très difficile, car tout facteur physique ou chimique agira d'abord sur la néoformation des racines .

2 - Chez Lilium (écailles), la formation d'un bourrelet méristématique, précédant l'apparition des points caulinaires (bulbilles), apparente cette modalité à ce qui est observé en culture de tissu ; de plus, le faible

nombre de bourgeons différenciés empêche d'utiliser avec efficacité les inhibiteurs du métabolisme. Enfin, il a été noté que la capacité de néoformation des bulbilles disparaît naturellement avec la différenciation des feuilles aériennes ; autrement dit, état tubérisé et bourgeonnement sont liés .

3. Chez un clone de Begonia rex une particularité très intéressante pour l'expérimentateur a été décelée : l'initiation des bourgeons s'effectue en effet exclusivement à partir des cellules différenciées privilégiées de l'épiderme supérieur situées immédiatement au contact de poils glanduleux ; ceux-ci constituent ainsi un marqueur histologique précieux pour une étude moléculaire de l'initiation des points caulinaires. Il est remarquable que l'épiderme inférieur, qui présente la même particularité structurale, ne forme pas de bourgeons. Ce clone de Begonia rex, a donc été retenu comme matériel d'étude. Déjà, on notera que l'initiation des bourgeons au niveau de tissu superficiel (épiderme ou assise sous-épidermique pour Begonia et Lilium, zone corticale de la racine néoformée pour Peperomia) indique que l'aptitude à exprimer ce caractère organogénétique se localise strictement au cours du développement .

x x
x

En second lieu, nous avons tenté de séparer les facteurs ou ensemble de facteurs intervenant dans la néoformation des bourgeons chez Begonia rex. Il faut retenir de cette étude les faits suivants :

1. Il apparaît clairement que la plante-mère inhibe naturellement la formation des bourgeons épiphylls sur les feuilles en place ; dans ce cas, la section des nervures (interruption du transit) ou l'application de substances stimulant le bourgeonnement (cytokinines) provoque la néoformation de points caulinaires. Ce résultat pourrait indiquer que l'inhibition de la morphogénèse serait liée à un déficit hormonal et trophique, provoqué par l'apex ou les jeunes feuilles en voie de croissance.

Une étude détaillée serait nécessaire pour l'analyse précise des corrélations d'inhibition existant entre la feuille et la plante .

2 - Le bourgeonnement est lié strictement à la position des cellules épidermiques différenciées comme nous l'avons montré. Nous avons recherché alors quels caractères pouvaient expliquer la localisation stricte des potentialités morphogénétiques ; cette étude nous a indiqué que le noyau des cellules privilégiées est appliqué contre la membrane de la cellule basale des poils glanduleux dans 85 % des cas observés ; il a été tenté alors de déterminer quel rapport pouvait exister entre cette cellule (qui ne participe pas à l'édification des points caulinaires) et les cellules contiguës. Par exemple, il était intéressant de contrôler l'hypothèse d'un message morphogénétique issue de la cellule basale dirigé vers les cellules situées à son contact, qui constitueraient alors un ensemble récepteur de cette information. L'isolement physiologique par des méthodes osmotique ou mécanique est difficile à réaliser et n'a pas donné de résultats probants ; la mise en contact avec un précurseur des ARN, l'uridine tritiée à des moments choisis au cours des premières 48 heures après la séparation, n'a pas permis jusqu'à maintenant de mettre en évidence un enrichissement passager en ARN au niveau de cette cellule basale, préalablement à l'activation des cellules privilégiées. L'étude comparée de protéines basiques nucléaires (dans la mesure où l'un de leurs rôles serait de bloquer certains gènes) et l'étude histochimique des acides nucléiques indiquent qu'au moment du prélèvement des explantats, les cellules épidermiques banales et les cellules épidermiques privilégiées sont semblables. Toutefois, les méthodes histochimiques utilisées sont probablement trop grossières pour visualiser des différences faibles, très localisées dans le noyau .

3 - Dans l'impossibilité technique de supprimer spécifiquement la cellule basale du poil glanduleux, c'est indirectement que nous avons montré que l'épiderme est le seul tissu à pouvoir exprimer la capacité à bourgeonner in vitro, lorsque des fragments pétiolaires (dont le comportement est

identique aux fragments foliaires) sont débarrassés de leur épiderme par décollement, le bourgeonnement est nul et ne peut être restauré par l'action de substances stimulatrices telles que les cytokinines ; des prélèvements internes de rhizome de Begonia rex sont incapables de former des points caulinaires ; des proliférations tissulaires obtenues après stimulation par l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, comportant des lignées cellulaires d'origine épidermique restent très fortement caulogènes, après deux années de culture ; au contraire, si l'épiderme est supprimé avant la stimulation hormonale, les cals, peu vigoureux, ne forment pas de bourgeons ; en conclusion de ces expériences, si on admet que l'aptitude au bourgeonnement dépend de gènes particuliers (gènes morphogènes), on constate que leur expression est possible seulement au niveau de l'épiderme .

4 - L'étude histologique nous a indiqué que les cellules privilégiées éloignées de la blessure restent totalement inertes. Par conséquent, l'interruption des corrélations avec la plante-mère n'est pas suffisante pour expliquer l'initiation des points caulinaires. L'étude des 2 pôles des explantats montre que la reprise d'activité mitotique est comparable dans les zones adjacentes à la blessure, 5 jours après la séparation. Or, le développement des bourgeons est strictement polarisé (section pétioleaire ou proximale des explantats). Deux conclusions se dégagent donc : d'abord, il est indispensable de séparer initiation et développement : dans notre cas, il n'y a pas de polarité d'initiation, mais seulement polarité du développement (qui est un phénomène secondaire) ; ensuite, la blessure semble bien constituer une des conditions de la réactivité cellulaire conduisant au bourgeonnement. La zone cicatricielle amorce son apparition dans les premières 24 heures (disparition des chromocentres, accumulation de protéines basiques et d'acides ribonucléiques dans le nucléole, accroissement de l'incorporation d'uridine dans le noyau) et, à la fin du premier jour, les premières synthèses d'acide déoxyribonucléiques s'effectuent, suivies rapidement de mitoses. Or, aucun de ces phénomènes n'est décelable dans la majorité des cellules qui donnent

naissance aux bourgeons. Ces observations nous incitent à penser que l'établissement des points caulinaires nécessite la conjonction de deux types d'information : une information mitotique dont l'origine serait la zone cicatricielle (dont nous soulignons l'intérêt pour l'étude des facteurs qui conduisent une cellule différenciée à retrouver une activité de division) et une information morphogénétique dont le contrôle pourrait être opéré par le poil glanduleux.

5 - La polarité de développement est liée selon toute vraisemblance à la conduction orientée qui s'établit au niveau de la nervure et qui détermine une stimulation privilégiée des zones d'initiation proximales ; si, en effet, on supprime les appels moléculaires dûs à celles-ci (lorsque le développement est amorcé), soit par un procédé chirurgical, soit par un procédé chimique (5-bromodéoxyuridine), on provoque le développement de bourgeons en position distale, c'est-à-dire une dépolarisation de la morphogénèse. Pour savoir si la polarité du développement était liée à une accumulation différentielle d'hormones aux deux extrémités d'un explantat, nous avons tenté d'étudier le bilan hormonal au cours de la morphogénèse : malheureusement, les méthodes d'analyse trop grossières pour des quantités très faibles de substances et la nécessité d'un volume de matériel végétal trop important ne nous permettent pas de donner une conclusion. Indiquons seulement que des substances ayant l'action des auxines, des gibbérellines et des cytokinines peuvent être caractérisées. Au cours de ces recherches, il a été vérifié que toutes les cytokinines étaient actives (en présence d'un précurseur, la tyrosine) sur la synthèse des bétacyanines dans l'hypocotyle d'Amaranthus retroflexus ; le protocole d'un test permettant le dosage de ces hormones dans des quantités faibles d'extraits végétaux a été établi. Remarquons que cet effet est intéressant du point de vue moléculaire, car l'un des ARN de transfert de la tyrosine contient une cytokinine comme base rare. A propos du dosage de substances naturelles ayant des propriétés de cytokinines, des résultats quantitatifs équivalents ont été obtenus par

l'utilisation d'un test de référence (moelle de tabac) et du test bétacyanine d'amarante ; ce dernier s'est montré beaucoup moins sensible aux inhibiteurs présents dans un extrait peu purifié .

x x
x

On pouvait s'interroger sur la nature de l'information organogénétique et, en particulier, rechercher si les hormones (considérées comme de véritables messagers chimiques, mais dont l'effet sur le métabolisme n'est pas encore clair) jouaient un rôle dans la néoformation des bourgeons, lorsqu'elles sont appliquées seules pendant un temps limité (généralement 24 heures) à un moment déterminé, choisi d'après les résultats de l'étude histologique. Après 5 semaines de culture ou plus, on peut retenir les faits suivants :

1 - Parmi les composés précurseurs ou dérivés du cycle adényliques ou pyrimidique, seules les cytokinines (administrées seulement pendant les premières 24 heures) provoquent un accroissement du bourgeonnement, faible pour la kinétine, considérable pour la 6-benzylammonopurine (multiplié par 8 ou 10). Cette dernière substance peut stimuler le développement de toutes les zones d'initiation dans la région proximale de l'explantat : la preuve histologique a été obtenue que cette stimulation s'exerce exclusivement sur les cellules différenciées privilégiées donnant naissance aux bourgeons. Cette sensibilité est due vraisemblablement à un état particulier et ces cellules peuvent constituer un système récepteur intéressant pour l'étude de l'action des cytokinines. La limitation naturelle du développement des zones d'initiation pourrait être liée à une carence en ces substances .

2 - Les auxines, seules ou combinées aux cytokinines, ont eu l'action désormais classique sur la morphogenèse ; un effet synergique a pu être mis en évidence de nouveau à certaines concentrations .

3 - L'acide gibbérellique inhibe définitivement le bourgeonnement s'il est donné pendant les premières 24 heures, mais un traitement différé d'une ou deux journées à une action moindre sur l'inhibition des points caulinares ; ce résultat est important, car il pourrait indiquer que certaines cellules privilégiées s'orientent rapidement et d'une manière irréversible vers le bourgeonnement. On notera qu'il y a possibilité d'annuler l'effet de cette hormone par la 6-benzylaminopurine. On peut évidemment se demander si l'acide gibbérellique ne joue pas un rôle dans la suppression naturelle du bourgeonnement sur des feuilles en place ; cette hypothèse, mériterait d'être étudiée et pourrait faire l'objet d'investigations futures .

Ces résultats ne permettent pas de dégager l'effet précoce de ces substances dans les premiers jours après la séparation de la plante-mère ; grâce à la localisation précise des cellules donnant naissance aux bourgeons, ce problème a pu être abordé par l'étude systématique de l'incorporation de thymidine tritiée au niveau de la section proximale des explantats au cours des 5 premiers jours après la séparation .

1 - Il apparaît qu'un laps de temps de trois jours est nécessaires à l'établissement du métabolisme conduisant à la 1ère replication de l'ADN dans les cellules privilégiées des fragments foliaires non traités. La mise en service des gènes contrôlant cette phase est donc très rapide ; toutefois 2/5 environ des zones d'initiation restent inertes, et parmi les zones activées, 16 % seulement entrent en mitose au cours du 5ème jour. Il s'est confirmé que la cellule basale du poil glanduleux restait inerte .

2 - La 6-benzylaminopurine a deux effets : elle avance d'un jour la phase de synthèse de l'ADN et elle permet de synchroniser l'apparition de la première mitose dans la presque totalité des zones privilégiées d'initiation ; cette qualité sera utilisée expérimentalement dans l'étude des antimétabolites .

3 - L'acide gibbérellique, par contre, empêche l'apparition de la phase de synthèse de l'ADN ; il contrarie, par conséquent, lorsqu'il est administré précocement, l'évolution métabolique qui fait passer les cellules privilégiées d'une phase indéfiniment quiescente à une phase nouvelle, cyclique, celle de la mitose. L'étude histochimique montre que cette substance annule la reprise de la synthèse des acides ribonucléiques, première manifestation de la dédifférenciation cellulaire. La moindre efficacité d'un traitement tardif pourrait s'expliquer par une induction irréversible de cette synthèse, sur laquelle l'acide gibbérellique serait alors sans effet. On doit souligner la diversité de l'action de cette hormone : elle stimule les mitoses de certaines cellules méristématiques, elle empêche l'apparition des divisions cellulaires dans le cas de cellules différenciées à pouvoir morphogène (soit racinaire, soit caulinaire), elle est sans effet sur l'activation mitotique de cellules différenciées banales provoquée par une blessure .

x

x

x

De nombreuses recherches indiquent que le métabolisme de l'adénine est impliqué dans le bourgeonnement. Dans le but de vérifier cette hypothèse pour le Begonia rex, nous avons étudié l'effet de la 2,6-diaminopurine, analogue qui est incorporé dans les acides nucléiques à la place de l'adénine. Cette substance inhibe le bourgeonnement d'une façon non durable : les bourgeons réapparaissent en effet spontanément après 8 semaines de culture et on note alors une faible stimulation de la morphogenèse et quelques modifications morphologiques au niveau des feuilles. L'action de la 2,6-diaminopurine est totalement réversée par l'adénine. L'étude effectuée au cours des 5 premiers jours apporte des éléments nouveaux : la phase S de synthèse de l'ADN est retardée d'une journée par rapport au témoin, mais l'initiation mitotique est stimulée dans un plus grand nombre de zones privilégiées d'initiation ; il y a par

conséquent un certain effet de cytokinine pour cette substance. L'apparition de bourgeons fonctionnels étant différée d'environ 4 semaines vis-à-vis des fragments non traités, on peut donc dire que cette substance trouble momentanément "l'information organogénétique", mais n'a pas d'effet durable sur "l'information mitotique" ; il serait donc possible grâce à la 2,6-diaminopurine de séparer les deux types d'information dont l'existence a été présumée précédemment.

C'est à la suite de ces expériences que nous avons fait l'hypothèse que certains ARN spécifiques plus riches en adénine pourraient avoir un rôle morphogène, par l'intermédiaire de protéines particulières, dans l'organisation d'une structure de type bourgeon. Cette hypothèse pourrait servir de base à une investigation plus poussée des catégories d'ARN apparaissant avec l'initiation des points caulinares .

Pour terminer, il faut insister sur l'impossibilité d'annuler l'effet de la 2,6-diaminopurine par une cytokinine, ce qui montre que ces deux dérivés de l'adénine ont des points d'impact différents dans la cellule. Le rôle des cytokinines dans le bourgeonnement pourrait être (après combinaison ou non avec un facteur médiateur spécifique) d'agir sur le génome en provoquant la synthèse des ARN particulier dont l'existence a été présumée précédemment .

x

x

x

En dernier lieu, nous avons tenté de rechercher par l'emploi des antimétabolites, le moment où l'induction au bourgeonnement devenait irréversible. Pour cette étude, il a fallu au préalable synchroniser la "réponse" des zones d'initiation par un traitement pendant les premières 24 heures par la 6-benzylaminopurine, traitement qui a aussi pour conséquence de renforcer le message morphogénétique. En applications séquentielles limitées au cours des 5 premiers jours, ces substances nous ont permis de montrer que le "conditionnement" des cellules

conduisant au bourgeonnement s'établit plus particulièrement au cours du 2ème jour après la séparation des explantats et se poursuit au cours du 3ème jour. Malheureusement, certaines de ces substances comme par exemple l'actinomycine D, affectent aussi bien le métabolisme général que le métabolisme particulier lié au bourgeonnement, ce qui interdit de conclure à l'existence d'ARN messagers spécifiques ; la 5-bromodeoxyuridine a permis de confirmer par une méthode métabolique les résultats d'incorporation de la thymidine tritiée concernant la période nécessaire à la réactivation des cellules privilégiées ; elle a surtout indiqué qu'aucune autre cellule épidermique, en phase quiescente au moment du traitement, n'est capable de prendre le relai pour le bourgeonnement, lorsque les mitoses des cellules privilégiées sont annulées par cet analogue. Ceci constitue une nouvelle preuve que l'expression de l'aptitude à bourgeonner n'est pas possible en dehors des cellules contiguës au poil glanduleux .

x

x

x

Le but originel de ce travail était de déterminer quelques facteurs pouvant intervenir dans l'apparition naturelle des bourgeons sur les explantats foliaires. Un clone de Begonia rex s'est avéré d'un grand intérêt pour traiter ce problème : il comporte en effet des cellules différenciées strictement localisées qui conservent seules la capacité de donner naissance à des bourgeons. Ce caractère, unique pour les végétaux supérieurs à notre connaissance, est précieux pour l'expérimentateur, car la réaction spécifique de ces cellules à diverses sollicitations peut être suivie avec précision par des méthodes histochimiques ou historadiographiques. L'apparition des bourgeons néoformés fait appel à deux ensembles d'informations qui ne sont pas liés obligatoirement : l'un de ces ensembles conduit des cellules indéfiniment quiescentes et différenciées à retrouver leur capacité mitotique et s'établit au cours des

4 premiers jours pour le *Begonia rex* ; l'autre concerne l'organogenèse, c'est-à-dire la répartition des mitoses menant à la structuration du méristème ; celle-ci est perceptible dans la première semaine qui suit la séparation des explantats et, donc, contemporaine de l'activation mitotique. Notre étude indique que plusieurs signaux successifs contrôlent l'initiation des points caulinaires :

1 - le premier signal est lié à l'interruption des corrélations avec la plante-mère, libérant ainsi les zones d'initiation de leur inhibition de développement .

2 - Le second signal, provoqué par le traumatisme, concernerait plus particulièrement l'information mitotique. En effet, il est apparu que la réactivation des zones d'initiation, qui s'effectue sans polarité dans les régions proches de la blessure, est postérieure à l'apparition des mitoses au niveau de la zone cicatricielle .

3 - le troisième signal concerne l'organogenèse et ne peut être perçu que par certaines cellules de l'épiderme. La position du noyau de ces cellules, noyau appliqué contre la cellule basale des poils glanduleux, fait penser à un contrôle exercé par celle-ci dans le processus de morphogenèse. L'effet de la 2,6-diaminopurine indique qu'il existe réellement, le message organogène est tributaire du métabolisme de l'adénine. L'hypothèse a été faite que le bourgeonnement pourrait être lié à la production de messagers morphogènes plus riche en adénine .

Cette étude, comme il fallait s'y attendre, pose des problèmes fondamentaux dont la résolution pourra faire l'objet de nouvelles recherches. Plus généralement, il faut insister sur l'importance de la position des cellules pour leur capacité d'expression . Ainsi, il a été souligné ici que les tissus superficiels sont aptes à produire des bourgeons, contrairement aux tissus périlibériens qui forment exclusivement des racines. Ceci signifie que certaines capacités organogénétiques

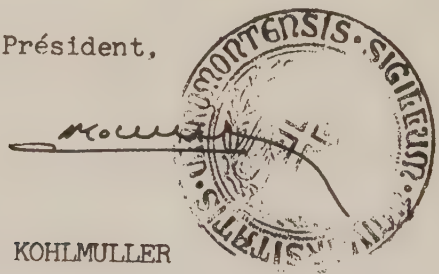
sont réprimées au cours de la différenciation et il est impossible actuellement d'obtenir une inversion de ces aptitudes ; des messages chimiques, comme les hormones, démasquent ou renforcent (en général) la tendance naturelle des tissus. Dans l'avenir, il nous paraît souhaitable de rechercher si la morphogenèse des végétaux supérieurs dépend de certains "gènes morphogènes", codant pour des protéines spécifiques assumant un rôle d'organisateur ; toutefois il se pourrait que l'imprécision actuelle de nos méthodes d'analyse limite la portée de telles études .

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

thèse n° 150 - Série E

CLERMONT-Fd, le 20 octobre 1971

Le Président,



R. KOHLMULLER

**Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif**

